



Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Trabajo de Tesina

Preparación y caracterización de Quantum Dots de Nitruro de Carbono. Estudio de sus propiedades espectroscópicas y aplicación en ensayos fotoquímicos y biológicos.

JULIETA NOVOMISKY NECHCOFF

DIRECCIÓN DEL DR. DANIEL O. MARTIRE CO-DIRECCIÓN DE LA
DRA. MARÍA BELÉN RIVAS AIELLO

Febrero 2020

Este trabajo de Tesina para acceder al título de Licenciada en Biotecnología y Biología Molecular, fue realizado en el Grupo de Fotoquímica y Cinética en Solución y en Sistemas Nanoestructurados del Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA) bajo la dirección del Prof. Dr. Daniel O. Mártire y la co-dirección de la Dra. María Belén Rivas Aiello.

A Viviana y Sergio, porque sin ellos no estaría acá.

A Matías y Tomás, por estar siempre.

ÍNDICE

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	4
Terapia fotodinámica	5
Terapia fotodinámica y nanotecnología	6
Quantum Dots de Nitruro de Carbono	7
El TMPyP como fotosensibilizador	8
Transferencia de energía	10
OBJETIVOS	12
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Materiales	15
Métodos	16
<i>Espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier</i>	16
<i>Espectroscopía de absorción UV – Visible</i>	17
<i>Espectroscopía de emisión</i>	19
<i>Fluorescencia en Estado Estacionario</i>	19
<i>Fluorescencia resuelta en el tiempo</i>	20
<i>Laser Flash Fotólisis</i>	20
<i>Detección de especies reactivas del oxígeno</i>	21
<i>Medidas de cuantificación de peróxido de hidrógeno</i>	21
<i>Medidas de fosforescencia de oxígeno singlete a 1270 nm</i>	22
<i>Cultivo celular</i>	22
<i>Citotoxicidad celular</i>	22
<i>Ensayo de reducción de MTT</i>	23
<i>Equipamiento menor</i>	23
CAPITULO I: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE QUANTUM DOTS DE NITRURO DE CARBONO	24
Introducción	25
Síntesis de CNQDs	26
Caracterización	28
<i>Espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier</i>	28
<i>Espectroscopía de absorción de UV – Visible</i>	30

<i>Emisión UV – Visible</i>	31
<i>Matrices de excitación – emisión</i>	32
<i>Espectroscopía de fluorescencia resuelta en el tiempo</i>	36
Conclusiones parciales	38
CAPÍTULO II: EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOS CNQDs DE ACTUAR COMO FOTOSENSIBILIZADORES	39
Introducción	40
Detección de especies reactivas del oxígeno	41
<i>Medidas de cuantificación de peróxido de hidrógeno</i>	41
<i>Medidas de fosforescencia de oxígeno singlete a 1270 nm</i>	42
Citotoxicidad celular	43
<i>Ensayo de reducción de MTT</i>	43
Conclusiones parciales	47
CAPÍTULO III: ESTUDIO DE LOS CNQDs COMO POTENCIADORES DEL FOTOSENSIBILIZADOR TMPyP	48
Introducción	49
Espectroscopía de absorbancia UV – Visible	51
Espectroscopía de emisión	53
<i>Espectroscopía de fluorescencia en estado estacionario</i>	53
<i>Espectroscopía de fluorescencia resuelta en el tiempo</i>	57
Laser Flash Fotólisis	59
Conclusiones parciales	64
CONCLUSIONES GENERALES	65
AGRADECIMIENTOS	68
BIBLIOGRAFÍA	70

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

μm	Micrómetro (10 ⁻⁶ metros)
μs	Microsegundo (10 ⁻⁶ segundos)
¹O₂	Oxígeno Singlete
³O₂	Oxígeno Molecular/Oxígeno Triplete
Å	Angstrom (10 ⁻¹⁰ metros)
A.U.	Unidades Arbitrarias
Abs	Absorbancia
ATR	Reflectancia Total Atenuada
CNQDs	Quantum Dots de Nitruro de Carbono
CO₂	Dióxido de Carbono
CQDs	Quantum Dots de Carbono
Cys	Cisteína
D₂O	Agua Deuterada
EET	Transferencia Electrónica de Energía
FBS	Suero Fetal Bovino
FTIR	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier
H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno
IR	Infrarrojo
LFP	Láser Flash Fotólisis
MEM	Medio Eagle Modificado
mJ	Mili Joules (10 ⁻³ Joules)
MTT	Bromuro de 3(4,5 dimetil -2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico
NIR	Infrarrojo Cercano
nm	Nanómetro (10 ⁻⁹ metros)
ns	Nanosegundo (10 ⁻⁹ segundos)
O₂^{·-}	Radical Superóxido
OH[·]	Radical Hidroxilo
PDT	Terapia Fotodinámica
PS	Fotosensibilizador
Rf	Riboflavina
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno
seg – s	Segundos
TMPyP	Tetraquis(4-N-metilpiridil) porfirina
UV	Ultra Violeta

λ	Longitud de Onda
λ_{em}	Longitud de Onda de Emisión
λ_{ex}	Longitud de Onda de Excitación
Φ	Rendimiento Cuántico
τ	Tiempo de Vida de Fluorescencia
Φ_F	Rendimiento Cuántico de Fluorescencia
Φ_{Δ}	Rendimiento Cuántico de Oxígeno Singlete

INTRODUCCIÓN

Terapia fotodinámica

El uso de luz como terapia en enfermedades humanas tiene una larga historia, remontándose varios siglos atrás, donde los egipcios, chinos e indios la usaban para tratar enfermedades como vitíligo y psoriasis, entre otras [1].

Posteriormente, la fototerapia se desarrolló como una ciencia y fue popularizada por el médico danés Niels Finsen, quien inició el uso de la misma como tratamiento para el lupus vulgaris, llevándolo a ganar un premio Nobel en 1903. Al mismo tiempo que esto ocurría, Oscar Raab describía el efecto letal que tenía la combinación de luz con acridinas en el protozoo *Paramecium*.

Actualmente la terapia fotodinámica (PDT, del inglés photodynamic therapy) se utiliza para el tratamiento curativo y paliativo de algunas formas de cáncer, lesiones precancerosas y de la degeneración muscular relacionada con la edad.

La PDT se basa en la inducción de la muerte celular por los efectos combinados de la luz, de un compuesto con propiedades fotosensibilizadoras (PS) y del oxígeno molecular ($^3\text{O}_2$). El tratamiento consiste en la aplicación del PS, que se acumula selectivamente en los tejidos tumorales debido a las características de los mismos – altos niveles de proliferación, bajo drenaje linfático y vasculaturas permeables –, seguido de la exposición a luz de una longitud de onda adecuada. La energía del PS que es excitado por la luz, es transferida al $^3\text{O}_2$ para dar oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y otras especies reactivas del oxígeno (ROS), como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical superóxido (O_2^-). Estos fotoproductos citotóxicos comienzan una cascada de eventos bioquímicos que inducen daño y muerte celular [2].

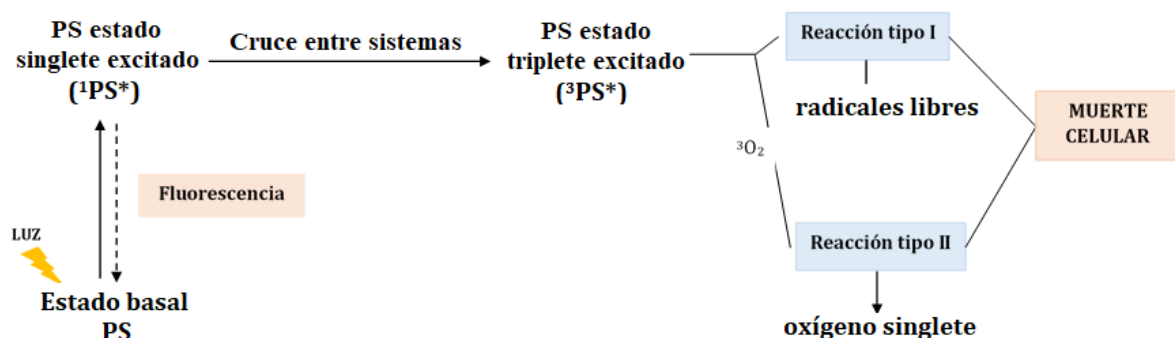


Figura 1. Mecanismo básico de acción de la terapia fotodinámica [3].

En la Figura 1 puede observarse el mecanismo básico de la terapia fotodinámica. El PS que se encuentra en el estado basal no excitado (PS) absorbe fotones de la fuente de luz con el que es irradiado poblando primero un estado excitado singlete ($^1\text{PS}^*$) y luego, a través de un cruce entre sistemas, decae a un estado excitado triplete ($^3\text{PS}^*$). La energía del PS excitado puede ser disipada por decaimiento térmico, por emisión de fluorescencia desde $^1\text{PS}^*$ o por fosforescencia desde $^3\text{PS}^*$. El estado triplete también puede reaccionar directamente con biomoléculas dentro de las células transfiriendo un átomo de hidrógeno o un electrón, generando de esta manera, ROS como las mencionadas

con anterioridad (reacciones tipo I). Además, el estado excitado triplete puede transferir su energía directamente a una molécula de oxígeno en su estado basal triplete, lo que origina la especie no radicalaria pero altamente reactiva, oxígeno singlete (reacciones tipo II).

Tantos las ROS como el oxígeno singlete terminan produciendo estrés oxidativo en las células, que culmina con la muerte celular.

Las principales ventajas de la PDT sobre otros métodos de tratamiento contra el cáncer son:

- Baja toxicidad sistémica, debido a que el PS es únicamente activado en la presencia de luz a una longitud de onda específica.
- Alta selectividad para la destrucción de tumores.
- Puede combinarse con otras modalidades terapéuticas, como la quimioterapia, cirugía, radioterapia e inmunoterapia.

Terapia fotodinámica y nanotecnología

El uso de nanopartículas representa una importante tecnología emergente en el campo de la PDT que ayuda a mejorar las limitaciones de los PS clásicos.

Las nanopartículas están definidas como partículas submicroscópicas de 1 a 100 nm de tamaño, y son diseñadas a partir de una gran variedad de materiales naturales o sintéticos, que pueden ser modificados para transportar los PS de una manera tejido-específica [3].

Pueden dividirse en nanopartículas pasivas o activas dependiendo de la presencia o ausencia de un PS en su superficie respectivamente. A su vez, estas se clasifican en [4]:

Nanopartículas pasivas:

Carriers biodegradables: son nanopartículas poliméricas y biodegradables que pueden utilizarse para transportar agentes antineoplásicos. Su principal ventaja yace en la capacidad de transportar altas concentraciones de droga, la posibilidad de controlar la liberación de la misma, y la existencia de una gran variedad de materiales y procesos para su síntesis.

Carriers no-biodegradables: Generalmente estas nanopartículas no se utilizan para el transporte de drogas debido a su incapacidad de liberar la misma de manera controlada.

Los PS, al no ser tóxicos por sí mismos actúan como catalizadores de reacciones de oxígeno, y al igual que muchos catalizadores, no son destruidos en el proceso, por lo que podrían ser reutilizados. Las nanopartículas no-biodegradables sirven entonces como carriers para que estos PS puedan usarse nuevamente.

Nanopartículas activas:

Nanopartículas fotosensibilizadoras: Algunos materiales con escala nanométrica tienen la habilidad de generar especies reactivas del oxígeno debido a sus propiedades ópticas de absorción, permitiendo que se comporten ellos mismos como PS.

Nanopartículas donoras de energía: Otras nanopartículas también pueden participar en la transferencia de energía hacia los PS que transportaron ellas mismas o que ya se encontraban en las células. Generalmente, la energía tomada de la luz es transferida a los PS de modo de activarlos indirectamente usando luz de longitudes de onda en las que el PS normalmente no absorbe [3].

Nanopartículas de conversión ascendente (en inglés Up-conversion nanoparticles): la conversión ascendente consiste en pasos secuenciales discretos de absorción y luminiscencia en donde al menos dos entes metaestables (usualmente iones) están involucrados, el primero funcionando como un reservorio de excitación y el segundo como el estado de emisión. Es un proceso eficiente que no requiere de radiación coherente y que involucra estados intermedios de tiempos de vida del orden de los microsegundos.

Las nanopartículas de conversión ascendente son composites de tamaño nanométrico modificados que generan luz de alta energía a partir de una fuente de radiación de baja energía, generalmente en el infrarrojo (IR) o en el infrarrojo cercano (NIR, del inglés near-infrared) [4].

Quantum Dots de Nitruro de Carbono

Los puntos cuánticos de carbono (CQDs, del inglés carbon quantum dots) fueron descubiertos por primera vez en 2004 por Xu et al. durante la purificación de nanotubos de carbono de pared simple. Desde entonces han recibido gran interés como materiales de carbono prometedores basándose en sus posibles aplicaciones en aparatos optoelectrónicos, fotocatálisis, electrocatálisis, obtención de bio-imágenes y PDT [5].

Los CQDs se definen como pequeñas nanopartículas de carbono con características muy importantes como lo son la alta estabilidad química, buena conductividad, baja toxicidad, amplia absorción óptica y fuerte fotoluminiscencia; además de su fácil y poco costosa síntesis a gran escala [6].

Aún más recientemente, los puntos cuánticos de nitruro de carbono (CNQDs, del inglés carbon nitride quantum dots) comenzaron a ser explorados debido a sus prometedoras aplicaciones en bio-imágenes y como biosensores. Anteriormente se utilizaban puntos cuánticos semiconductores, sin embargo, estos inducían graves problemas de salud y al medio ambiente debido a que contenían metales pesados. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas partículas fluorescentes sin metales pesados, como lo son los CNQDs es de gran interés [7].

Los CNQDs tienen propiedades ópticas y de emisión únicas que pueden ser precisamente calibradas en la región UV e infrarroja. La superficie de estas nanopartículas, además, puede ser modificada agregando grupos funcionales u otros compuestos que complementen su acción. Más aún, los CNQDs poseen un gran momento dipolar de transición, haciéndolos fuertes absorbentes de luz e ideales para su aplicación en la terapia fotodinámica.

Los CNQDs también pueden actuar como donores de energía, y transferir dicha energía a moléculas celulares como el $^3\text{O}_2$, induciendo así la generación de ROS que lleven a la muerte celular. Dicha energía también puede ser transferida a un PS presente en la célula, aumentando su actividad y generando acción aun a longitudes de onda en las que el PS no es sensible [4].

El TMPyP como fotosensibilizador

Las porfirinas son macrociclos aromáticos derivados de las porfinas; estos son pigmentos orgánicos tetrapirrólicos y algunos de sus derivados forman la mayoría de los PS aprobados para aplicaciones biomédicas.

Un PS óptimo debe tener las siguientes propiedades físicas, químicas y fotobiológicas para su aplicación en tratamientos:

- i. Debe ser una droga pura, con buena estabilidad y solubilidad en fluidos fisiológicos.
- ii. Debe tener una fuerte absorción en la región espectral de 600 – 850 nm.
- iii. Debe generar altas concentraciones de ROS.
- iv. No debe ser tóxico en oscuridad en las concentraciones utilizadas, y debe tener alta especificidad por el tejido blanco.
- v. Debe ser rápidamente eliminado del cuerpo para minimizar efectos fototóxicos secundarios.

Debido a que muchas porfirinas tienen problemas de solubilidad, se desarrolló la porfirina catiónica meso-tetra(4-N-metilpiridil)porfirina, más conocida como TMPyP. Este es un compuesto heterocíclico que contiene cuatro anillos pirroles unidos por cuatro

puentes metilo, esenciales para las reacciones fotoquímicas y de transporte de electrones (Figura 2).

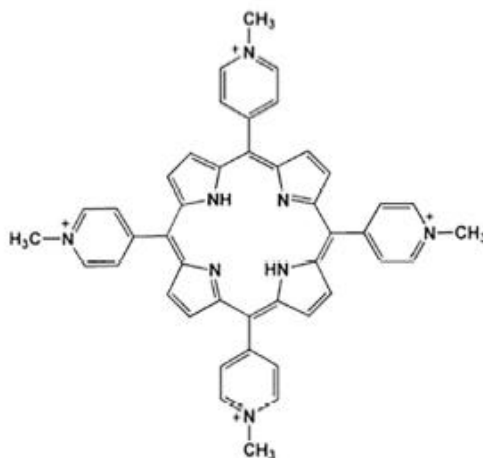


Figura 2. Estructura del TMPyP

El TMPyP presenta varias bandas de absorción en solución acuosa, la más fuerte en la región del azul (banda B), aunque a longitudes de onda más largas el espectro contiene cuatro picos más débiles, pero aun así intensos, llamados bandas Q que presentan absorción en las regiones verde y rojas del espectro. La emisión de fluorescencia del TMPyP en solución acuosa tiene dos picos característicos en la región del rojo del espectro visible, entre 649 – 655 nm y 715 – 720 nm, respectivamente (Figura 3) [8].

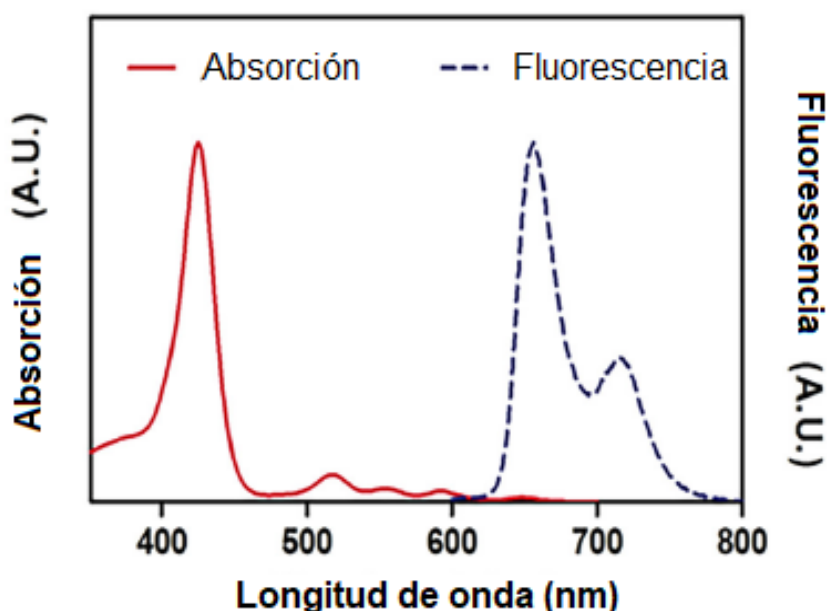


Figura 3. Espectro de absorción (rojo) y emisión de fluorescencia (azul) del TMPyP.

Diferentes grupos de investigación han analizado la localización subcelular del TMPyP basándose en su emisión de fluorescencia roja. El compuesto se acumula

principalmente en lisosomas y en el aparato de Golgi, ambas organelas conocidas por ser ricas en oxígeno. Sin embargo, luego de la activación con luz, un aumento en la cantidad de ROS genera la ruptura de estas organelas mencionadas, haciendo que el TMPyP se relocalice rápidamente en el núcleo celular, en donde se une con alta afinidad a las hebras de ADN aniónicas debido a su naturaleza catiónica [8].

El TMPyP ha sido estudiado por más de 25 años, y es descripto como un PS prometedor para la PDT, esto se debe a su habilidad de generar ROS luego de su activación lumínica. Estos compuestos, como se ha mencionado anteriormente, causan alteraciones intracelulares en componentes claves como el citoesqueleto y el ADN, a quien oxidan induciendo la muerte celular [8].

Se ha reportado el efecto terapéutico del TMPyP luego de su activación contra una gran variedad de líneas celulares de cánceres humanos incluyendo cáncer de mama, melanoma, cáncer de cérvix, leucemia, cáncer de pulmón, ovarios, colon y laringe. Las células normales muestran una capacidad reducida para acumular la porfirina comparada con células cancerígenas, esto puede deberse a sus metabolismos más lentos, provocando una toma reducida del PS y por lo tanto a una menor producción de ROS luego de la fotoactivación [8].

Transferencia de energía

La interacción entre el estado excitado y el estado basal de dos moléculas ha sido sujeto de considerable interés. La primera observación de transferencia de energía fue hecha por Cario y Franck en 1922, en un clásico experimento de fluorescencia de átomos en fase vapor. Estos investigadores irradiaron una mezcla de vapores de mercurio y talio con luz en el espectro de absorción del mercurio, y observaron espectros de emisión de ambos átomos. Debido a que el talio no era excitado con la longitud de onda de trabajo, concluyeron que debía ocurrir una transferencia no-radiativa con los átomos de mercurio como los donores o sensibilizadores, y los átomos de talio como los aceptores. Más adelante, J Perrin y Choucroun, realizaron las primeras observaciones de este fenómeno en solución [9][10].

La transferencia electrónica de energía (EET, del inglés electronic energy transfer) puede ocurrir a distancias de entre 1 a 50 Å, y en escalas de tiempo que van de los femtosegundos (10^{-15} seg) a los milisegundos (10^{-3} seg). Además, puede haber EET en el estado sólido, en superficies, soluciones, fase gaseosa y en sistemas moleculares aislados [9].

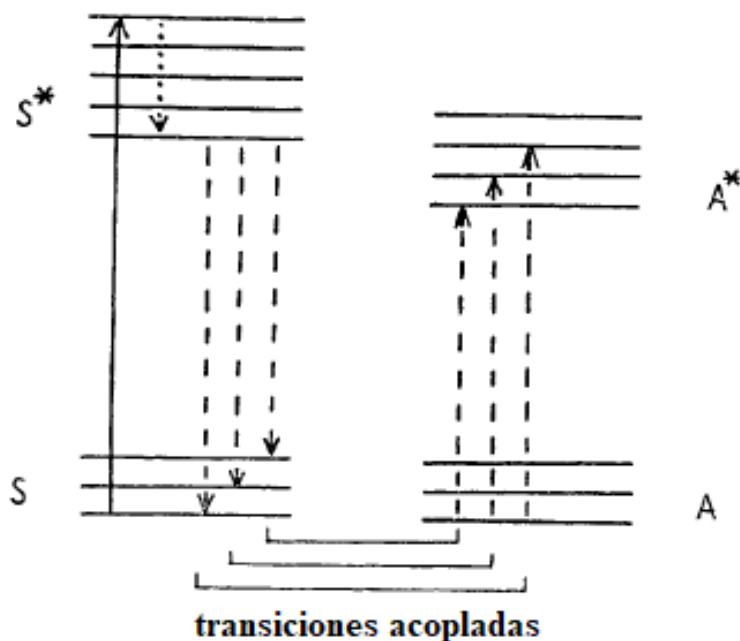


Figura 4. Diagrama simplificado de los niveles de energía del sensibilizador (S) y el aceptor (A). La flecha sólida indica transiciones radiativas; la flecha punteada indica transiciones no-radiativas; y la flecha de guiones indica transiciones de transferencia.

La Figura 4 representa un diagrama simplificado para los niveles de energía de las dos moléculas involucradas en el proceso de transferencia, el sensibilizador o donador (S) y el aceptor (A) [10]. Durante el proceso de EET ocurre un proceso de transferencia no-radiativa desde un sensibilizador excitado (S*) a una molécula aceptora. La transferencia es un proceso intermolecular que se puede describir en términos de un proceso de quenching bimolecular [9]:



Supongamos que la diferencia de energía de uno de los procesos de desactivación posibles en la molécula sensibilizadora (flechas de guiones para $S^* \rightarrow S$) se corresponde exactamente con la posible transición de absorción de una molécula aceptora cercana (flechas de guiones para $A \rightarrow A^*$). Si ambas transiciones están suficientemente acopladas entre sí, ambos procesos pueden ocurrir simultáneamente, resultando en la transferencia electrónica de energía desde el sensibilizador al aceptor [10].

OBJETIVOS

En este trabajo de tesina se proponen los siguientes objetivos:

- Sintetizar y caracterizar Quantum Dots de Nitruro de Carbono (CNQDs) mediante métodos físicos y químicos.
- Estudiar la aplicación de estas nanopartículas como posibles fotosensibilizadores a utilizar en terapia fotodinámica.
- Investigar el efecto de los CNQDs sobre la fotofísica de la porfirina TMPyP [5,10,15,20-Tetrakis(1-metil-4-piridinio)porfirina tetra(p-toluenesulfonato)] en solución.
- Realizar ensayos de toxicidad celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Reactivo	Fórmula	Marca
Ácido Cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	Sigma Aldrich
Ácido Clorhídrico	HCl	Cicarelli
Ácido Nítrico	HNO ₃	Cicarelli
Ácido Sulfúrico	H ₂ SO ₄	Cicarelli
Agua Deuterada	D ₂ O	Sigma Aldrich
Bromuro de 3-(45-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)	C ₁₈ H ₁₆ BrN ₅ S	Sigma Aldrich
Cisteína	C ₃ H ₇ NO ₂ S	Fluka-Garantie
Citrato de Sodio	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	Cicarelli
Dimetilsulfóxido	C ₂ H ₆ SO	Merck
MEM	---	GIBCO
Meso-tetra(N-metil-4-piridil)porfirina (TMPyP)	C ₇₂ H ₆₆ N ₈ O ₁₂ S ₄	Sigma Aldrich
Peróxido de hidrogeno	H ₂ O ₂	Anedra
Riboflavina	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	Sigma Aldrich
Rojo Neutro	C ₁₅ H ₁₇ N ₄	Sigma Aldrich
Suero Fetal Bovino (FBS)	---	Internegocios S.A.
Urea	CH ₄ N ₂ O	Cicarelli

Todos los experimentos se realizaron utilizando agua ultra pura.

Se utilizó gas Argón en calidad de 4 bandas.

El material de vidrio se limpió cuidadosamente para evitar contaminaciones utilizando las siguientes soluciones:

- Solución “piraña”: solución fuertemente oxidante que destruye materia orgánica. Está compuesta por H₂SO₄ concentrado y H₂O₂ 100 vol. en una relación volumétrica 3:1.
- Agua regia: se utilizó para limpiar materiales que estuvieron en contacto con metales. Consiste en HCl y HNO₃ concentrados en relación 3:1.

MÉTODOS

Espectrometría infrarroja por Transformadas de Fourier (FTIR, del inglés Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

Los espectros infrarrojos resultan de transiciones entre los estados de energía vibracionales. Estas vibraciones moleculares comprenden desde los movimientos dobles simples de dos átomos en una molécula diatómica al movimiento mucho más complejo de cada átomo en una gran molécula polifuncional.

Para muchos modos vibracionales, solo unos pocos átomos tienen grandes desplazamientos y el resto de la molécula está casi en estado estacionario. La frecuencia de dichos modos es característica de un grupo funcional específico en donde se centra el movimiento y está mínimamente afectado por la naturaleza del resto de los átomos de la molécula. De esta forma, observar las características espectrales de cierta región del espectro da, generalmente, un indicativo de un grupo funcional químico específico en la molécula.

Cada molécula tiene modos vibracionales ligeramente diferentes al resto de las moléculas, por lo tanto el espectro infrarrojo de una molécula en particular es único y puede ser usado para su identificación [11].

Existen distintas maneras para obtener espectros en el infrarrojo, entre las que encontramos la espectroscopia IR de transmisión, reflexión y emisión.

Para el interés de este trabajo resulta importante hablar de la espectroscopia IR por reflexión.

Un accesorio ATR (del inglés, Attenuated Total Reflectance) opera midiendo los cambios que ocurren en la reflexión interna total del rayo infrarrojo cuando el rayo se pone en contacto con la muestra (Figura 1). El rayo infrarrojo es dirigido a un cristal óptico denso con un alto índice de refracción a un cierto ángulo. Esta refractancia interna crea una onda evanescente que se extiende más allá de la superficie del cristal hacia la muestra en contacto con el cristal. Esta onda solo atraviesa unos pocos micrones ($0,5\mu\text{m}$ - $5\mu\text{m}$) más allá de la superficie del cristal y dentro de la muestra. Consecuentemente, debe haber un buen contacto entre la muestra y la superficie del cristal. En las regiones del espectro IR en donde la muestra absorbe energía, la onda evanescente se ve atenuada o alterada. Esta energía atenuada es pasada nuevamente al rayo IR, quien atraviesa en el lado opuesto del cristal y pasa al detector en el espectrómetro IR, generando así el espectro IR [12].

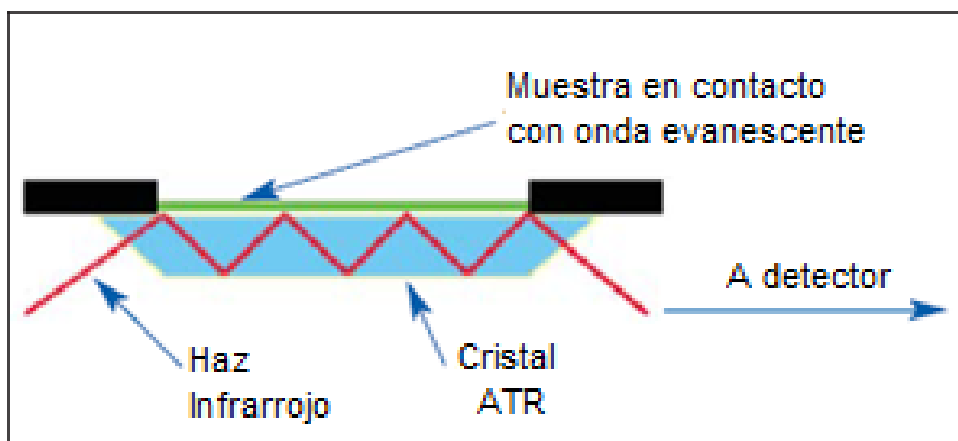


Figura 1. Funcionamiento de Sistema ATR.

Las medidas para este trabajo fueron realizadas con un espectrómetro FTIR Agilent Cary 630 con un accesorio ATR Single Bounce que posee un cristal de diamante. El mismo se muestra en la Figura 2.



Figura 2. Cary 630 con accesorio ATR 1-bounce.

Espectrometría de absorción UV-Visible

La absorción de radiación electromagnética es un proceso por el cual la materia absorbe energía mediante la interacción con un fotón. Esta absorción está asociada con la excitación de electrones a nivel molecular, desde un nivel energético de menor energía a uno de mayor energía. Como los niveles de energía de la materia pueden ser cuantificados, solo la luz que contiene una precisa cantidad de energía puede causar las transiciones entre los distintos niveles energéticos.

La Figura 3 muestra algunas transiciones que en moléculas orgánicas pueden dar lugar a la absorción de luz en la región UV-Visible:

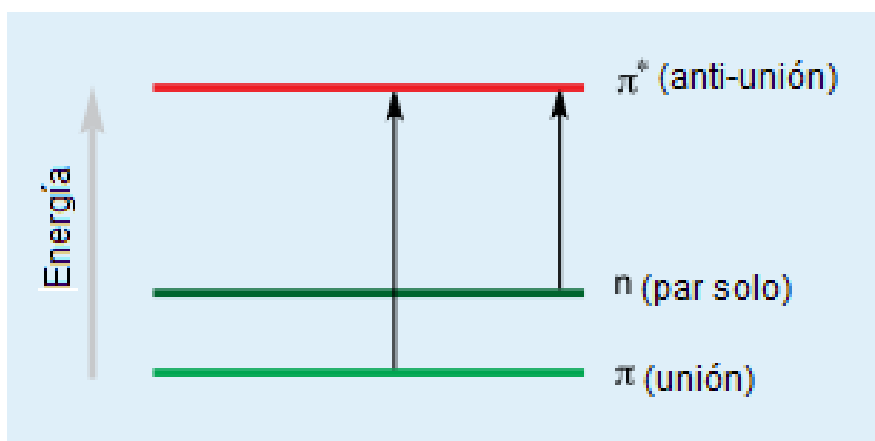


Figura 3. Ejemplos de transiciones electrónicas en la región UV-Visible.

Los espectrómetros UV-Visibles pueden ser usados para medir la absorbancia de una muestra en la región UV-Visible. La región UV va de los 190 a los 400nm, mientras que la región visible va de los 400 a los 800 nm [13].

De acuerdo con la Ley de Beer (reacción 1), la absorbancia (A) es directamente proporcional a la concentración de las especies absorbentes, C ; la longitud de la trayectoria, b ; y una constante de proporcionalidad llamada absortividad, identificada por la letra griega ϵ . Cuando se expresa la concentración en moles por litro y la longitud en cm, la constante de proporcionalidad se llama absortividad molar y se representa con ϵ .

$$A = \epsilon b C$$

Reacción 1

A medida que la luz atraviesa el medio que contiene el analito, la intensidad de la radiación disminuye a medida que el analito es excitado.

Las medidas de Absorbancia se hicieron con un espectrómetro UV/Visible PG Instruments T90+ (Figura 4).



Figura 4. Soporte para celdas en el Espectrofotómetro T90+.

Espectroscopia de Emisión

• *Espectroscopia de Fluorescencia en Estado Estacionario*

La fluorescencia es un proceso de fotoluminiscencia en el cual los átomos o moléculas son excitados mediante la absorción de radiación electromagnética. Las especies excitadas luego se relajan hasta el estado basal, liberando el exceso de energía en forma de fotones.

Las bandas de fluorescencia se producen cuando las moléculas se relajan desde el estado excitado vibracional más bajo, E_1 , hacia los distintos niveles vibracionales del estado basal, E_0 (Figura 5).

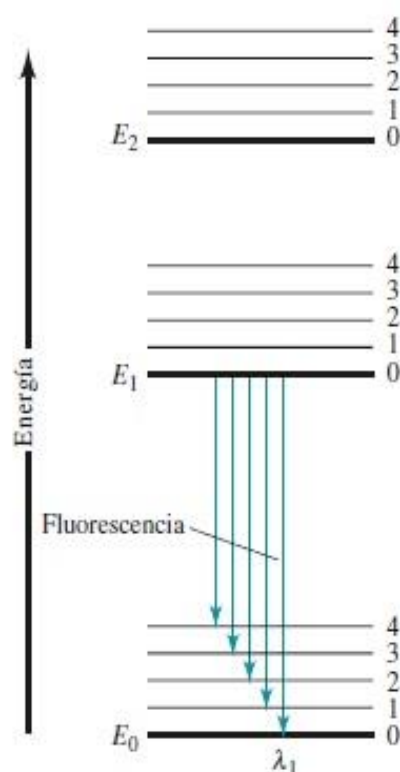


Figura 5. Diagrama de niveles de energía que muestra algunos de los procesos que ocurren durante la emisión de fluorescencia por una especie molecular.

La transición desde el estado E_1^0 hacia el estado el estado vibracional más bajo del estado basal, E_0^0 , tiene la mayor energía de todas las transiciones en la banda. Por lo tanto, todas las otras líneas que terminan en niveles vibracionales mayores tienen menor energía y producen emisión de fluorescencia en longitudes de onda mayor que λ_1 . En conclusión, las bandas de fluorescencia molecular constan en gran parte de líneas que son mayores en longitud de onda que la banda de radiación absorbida responsable de su excitación. Este desplazamiento se conoce como desplazamiento de Stokes [14].

Para realizar las obtenciones de los distintos espectros de fluorescencia se usó el espectrofluorómetro HORIBA JOBIN-YVON Spex Fluorolog FL3-11 con un ancho de

rendija para la entrada de la luz de excitación y la salida de la luz de emisión de 3 nm. El paso de longitud de onda de barrido usado fue de 1nm. Este equipo cuenta con una lámpara de Xenón de 450 W y posee además 2 tipos de monocromadores – uno optimizado para longitudes de onda de 330 nm y otro de 550 nm.

La emisión es recogida a 90° del haz de excitación por un detector R928P que consta de un fotomultiplicador.

- *Espectroscopia de Fluorescencia resuelta en el tiempo*

Las medidas fueron realizadas en el mismo equipo descrito antes (HORIBA JOBIN-YVON Spex Fluorolog FL3-11) con la técnica TCSPC (del inglés, Time-correlated single photon counting).

Esta técnica es utilizada para medir el decaimiento de la fluorescencia en el tiempo. Se basa en la detección de fotones de una señal de luz periódica, en la medida del tiempo dentro de esos periodos de luz y de la reconstrucción de la forma de onda entre las medidas individuales. Los eventos de los fotones de excitación que son detectados y el tiempo de llegada se correlacionan con el pulso del nanoled utilizado para la excitación de la muestra [15].

Láser Flash Fotólisis

La técnica de Laser Flash Fotólisis (LFP, del inglés Laser Flash Photolysis) es comúnmente utilizada para estudiar reacciones fotoquímicas que ocurren rápidamente. Es una metodología que permite elucidar las etapas elementales de un proceso fotoquímico irradiando una muestra determinada con un pulso de alta intensidad y de corta duración, de esta forma se generan altas concentraciones de intermediarios de reacción y se puede seguir dichos productos mediante la irradiación.

El láser debe cumplir que sus pulsos sean cortos, debido a que dicha duración determinará los procesos que puedan ser analizados mediante esta técnica. Se usó un láser Nd:YAG Surelite II Continuum. El haz de luz emitido por la lámpara de análisis (de Arco de Xenón de 150W) atraviesa la celda de cuarzo de 1 cm de camino óptico que contiene la muestra. Luego pasa por el monocromador y finalmente es colectado por un fotomultiplicador. Se utiliza un osciloscopio (detector, Agilent Infiniium 500 MHz) para tomar las señales de decaimiento, obtenidas usando un promedio de 64 pulsos.

La longitud de onda usada es seleccionada teniendo en cuenta el espectro de absorción de la especie que se desea medir; parte de esta luz es absorbida por los radicales o estados excitados generados durante la fotólisis, por lo que la señal en el fotomultiplicador disminuirá a partir del pulso de fotólisis y luego retomará el nivel inicial a medida que los radicales o estados excitados reaccionan.

En conclusión, la señal de absorción del radical o estado excitado aumenta instantáneamente debido a su generación por el pulso de fotólisis, y luego decae según la forma de reacción de la especie.

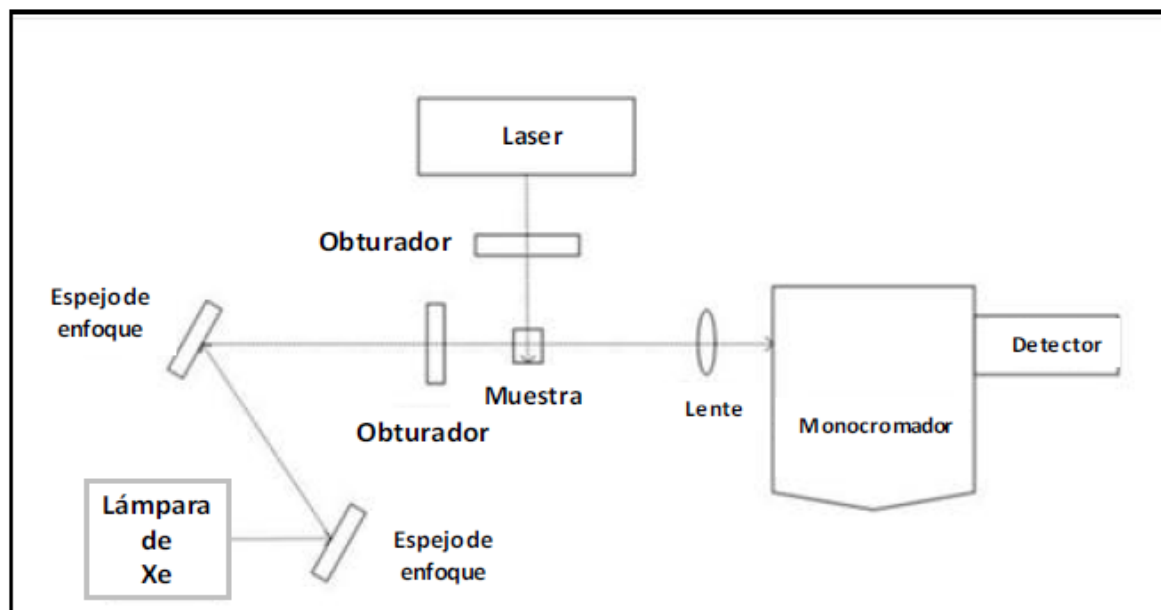


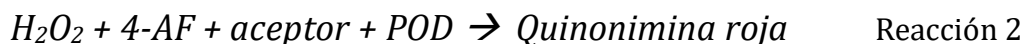
Figura 6. Esquema simplificado del espectrofotómetro utilizado

El espectrofotómetro usado fue el Edinburgh Instruments LP980, en la Figura 6 se muestra un esquema simplificado.

Detección de especies reactivas del oxígeno

• Medidas de cuantificación de peróxido de hidrógeno

Para cuantificar la producción de H_2O_2 por las muestras, se usó un método colorimétrico enzimático basado en la reacción 2 [16].



En donde 4-AF es la 4-aminofenazona y POD es la enzima peroxidasa.

La fuente de excitación fueron lámparas de 354 nm. A distintos tiempos de irradiación se retiró una alícuota de 1 mL de muestra, que fue incubado con 1 mL de reactivo durante 10 minutos a 37°C. La absorción a 505 nm fue medida en el espectrofotómetro descripto antes, de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Las absorbancias obtenidas se compararon con una curva de calibración realizada con concentraciones conocidas de H_2O_2 para poder calcular así la cantidad de peróxido de hidrogeno generado.

El kit enzimático utilizado fue el Colestat enzimático AA líquida, de la marca Wiener lab.

- *Medidas de fosforescencia de oxígeno singlete a 1270 nm*

La producción del oxígeno singlete generado por las nanopartículas fue determinada aprovechando el perfil espectral característico del oxígeno singlete y explotando la banda estrecha que se genera a 1275 nm cuando ocurre la relajación radiactiva desde el estado singlete de menor energía hasta el estado triplete basal del oxígeno molecular [17].

En el ensayo se utilizaron soluciones concentradas de los distintos CNQDs en D₂O; estas soluciones fueron excitadas con el armónico de 355 nm de un láser Nd:YAG Surelite II Continuum. La radiación emitida fue detectada en un ángulo recto por un amplificador Judson J 116/8sp y en detector de germanio de 5 mm de diámetro. Los decaimientos de fosforescencia se promediaron y almacenaron en un osciloscopio Agilent Infiniium 500 MHz.

Para las medidas se utilizó D₂O debido a que el tiempo de vida del oxígeno singlete aumenta en agua pesada. Esto permite que las medidas de fosforescencia puedan realizarse con un detector de tiempo de respuesta mayor [17].

Cultivo Celular

Se hizo crecer células de carcinoma humano (HeLa) en medio Eagle modificado (MEM, del inglés: Modified Eagle's Medium), con 10% de suero fetal bovino (FBS, del inglés: Fetal Bovine Serum) y 100 µg/mL de penicilina. El cultivo de estas células se realizó en una incubadora con 5% CO₂ y 95% de aire a 37°C.

Se sembraron 1,5x10⁴ células por well en placas de 96-wells y se dejaron crecer por 24 horas hasta observar confluencia.

Citotoxicidad celular

Luego del crecimiento de las células en placas multi-well por 24 horas, el medio fue removido y las células se incubaron 24 horas más con diferentes concentraciones de cada una de las CNQDs suspendidas en MEM, en oscuridad o en presencia de luz.

Todos los experimentos fueron comparados con respecto a un control de células al que no se les aplicó ningún tratamiento.

El ensayo de citotoxicidad utilizado para evaluar la viabilidad de las células luego de aplicados los distintos tratamientos fue:

- *Ensayo de reducción de MTT*

Este ensayo se utiliza para determinar la viabilidad de células mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de células viables [18].

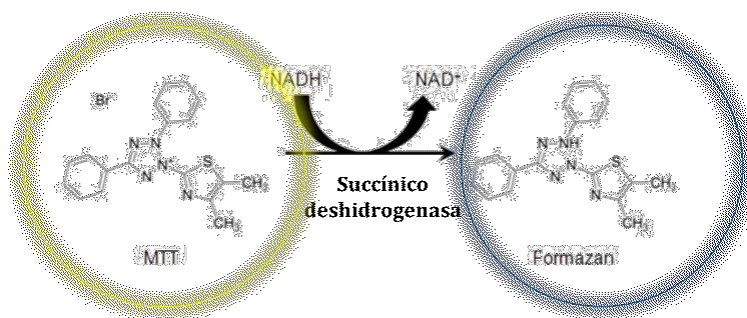


Figura 7. Esquema de la reacción involucrada en el ensayo MTT

El MTT (bromuro de 3(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico), originalmente de color es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazán, que tiene color azul (Figura 7). El producto de la reacción queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas.

De esta forma, se cuantifica la cantidad de MTT reducido mediante un método colorimétrico en donde el mide el cambio de color de azul a amarillo a 540 nm [19].

La capacidad de las células para reducir el MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir al MTT a formazán después de su exposición al compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa [20].

Equipamiento menor

- Los reactivos fueron pesados en una balanza electrónica Denver modelo TP-214 de $\pm 0,1$ mg de precisión.
- Para experimentos que requerían la ultrasonificación de soluciones, se utilizó un equipo TESLAB S.R.L. modelo TB04TA con potencia de 160 W y frecuencia de 60 kHz.
- El secado de las nanopartículas se llevó a cabo en un evaporador rotatorio Senco Modelo R206, acoplado a una bomba mecánica de vacío. Los gases evacuados se atraparon con una trampa de hielo.
- La síntesis de las nanopartículas se realizó en un horno mufla F.A.C. (Fábrica de Aparatos Científicos).
- Los experimentos de irradiación se realizaron utilizando un reactor fotoquímico RPR-100 Rayonet.

CAPÍTULO I

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE QUANTUM DOTS
DE NITRURO DE CARBONO

Introducción

Como se comentó en la introducción, en los últimos años los nanomateriales en general, y más específicamente los nanomateriales de nitruro de carbono, se han convertido en un área de gran interés [21]. Desde que fueron descubiertos en 2004, se han realizado grandes avances en su desarrollo debido a sus posibles aplicaciones como fotocatalizadores, biosensores y materiales para bio-imágenes. Esto se debe a sus propiedades únicas entre las que encontramos: la alta luminiscencia, su buena biocompatibilidad y su baja toxicidad, haciéndolos candidatos excelentes para usos biológicos.

El interés de investigación en los CNQDs ha llevado a que se desarrollen numerosos métodos de síntesis como: la oxidación electroquímica, el tratamiento ultrasónico, métodos de síntesis con microondas, tratamientos térmicos en sólido y tratamientos hidrotérmicos [5].

En el presente trabajo, se probaron distintos métodos de síntesis térmica en sólido, en los que las variables fueron los precursores de síntesis y la temperatura. Una vez obtenidos los nanomateriales, se les realizaron distintos ensayos de caracterización química y física.

Síntesis de los CNQDs

Para la síntesis de las distintas nanopartículas se utilizó una relación 6:1 en moles de diversas fuentes de nitrógeno y de carbono, respectivamente. Cada una de las síntesis fue planteada usando diferentes precursores y distintas temperaturas de calcinación como se resume en la Tabla 1.1 [7] [22].

CNQDs	Fuente de nitrógeno	Fuente de carbono	Temperatura de calcinación	Tiempo de síntesis
Urea 180	Urea	Citrato de Sodio	180°C	1 hora
Cys 300	Cisteína	Citrato de Sodio	300°C	2 horas
Cys 250	Cisteína	Citrato de Sodio	250°C	2 horas
Cys 200	Cisteína	Citrato de Sodio	200°C	2 horas

Tabla 1.1. Resumen de los métodos de síntesis utilizados en este trabajo. En todos los casos la masa de citrato de sodio utilizada fue de $0,40 \pm 0,01$ g.

Los distintos precursores fueron pesados en balanzas analíticas y colocados en un crisol de cerámica; luego se calcinaron en una mufla a la temperatura y tiempo correspondiente de cada síntesis. Una vez terminado el proceso de calcinación, el sólido obtenido se solubilizó en agua ultra pura y se centrifugó a máxima velocidad durante 10 minutos de forma de eliminar sólidos que no lograron solubilizarse. Por último, las soluciones se filtraron con filtros de nylon de $0,22 \mu\text{m}$ para eliminar nanopartículas de gran tamaño [23].

La Figura 1.1 muestra el aspecto final de las suspensiones de las distintas nanopartículas obtenidas.

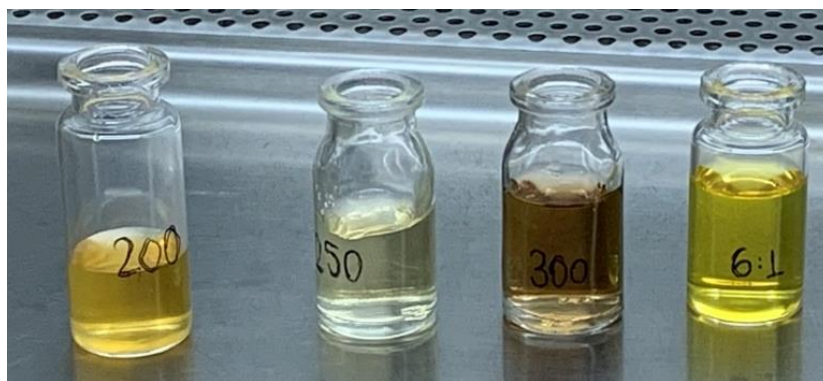


Figura 1.1. Suspensiones acuosas de las nanopartículas. *De izquierda a derecha:* CNQDs Cys 200 [4.08 mg/ml]; CNQDs Cys 250 [1.64 mg/ml]; CNQDs Cys 300 [1.68 mg/ml]; CNQDs Urea 180 [2.58 mg/ml].

Caracterización de los CNQDs

Espectrometría infrarroja por Transformadas de Fourier

Para obtener información sobre la naturaleza química superficial de las nanopartículas se estudiaron sus grupos funcionales mediante la técnica ATR-FTIR.

Las medidas se realizaron sobre muestras sólidas de los distintos CNQDs que fueron obtenidas evaporando el solvente en rotavapor a una temperatura de baño de 65°C durante 3 horas y una velocidad de rotación de 75 rpm y 1 bp de sobrepresión.

Como podemos observar en las Figuras 1.2-5, hay picos característicos de los CNQDs que se encuentran en las cuatro nanopartículas obtenidas en este trabajo.

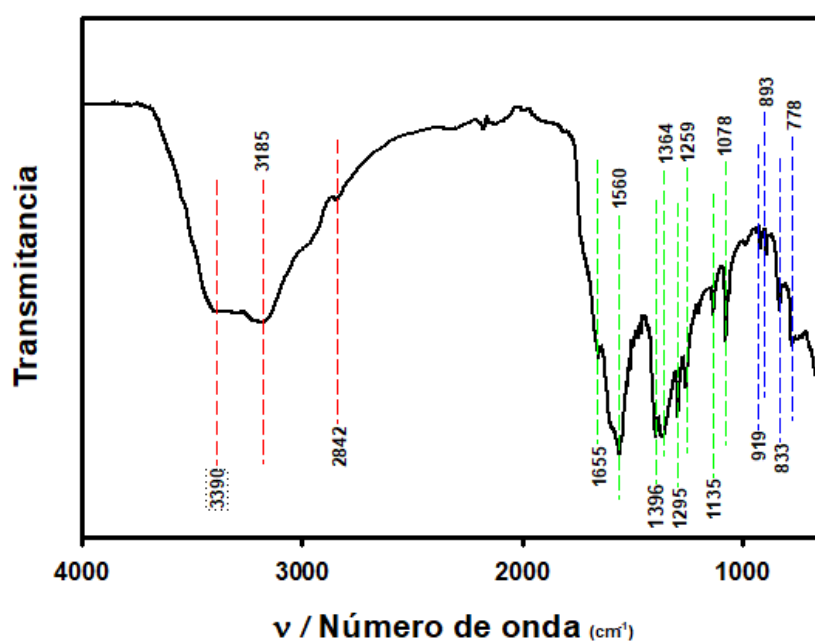


Figura 1.2. Espectro ATR-FTIR para los CNQDs Urea 180,

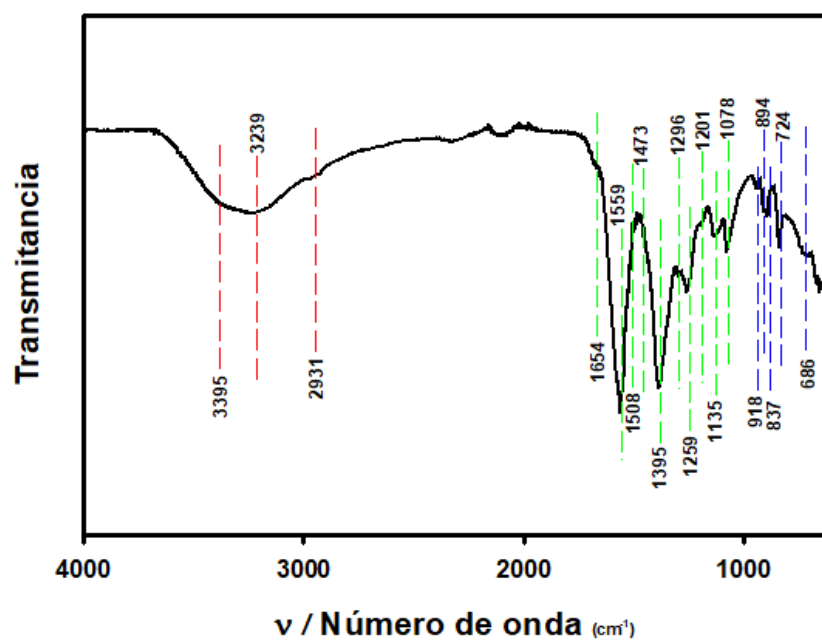


Figura 1.3. Espectro ATR-FTIR para los CNQDs Cys 300,

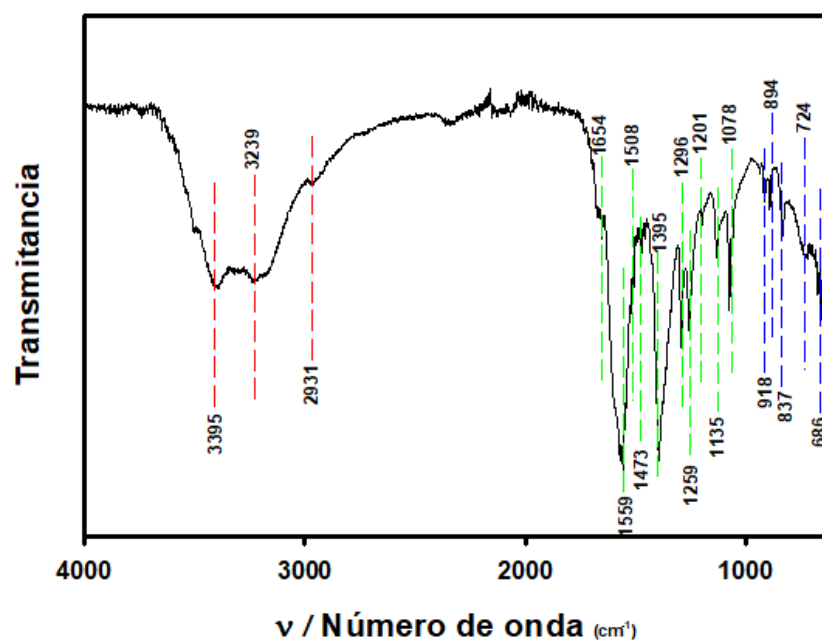


Figura 1.4. Espectro ATR-FTIR para los CNQDs Cys 250,

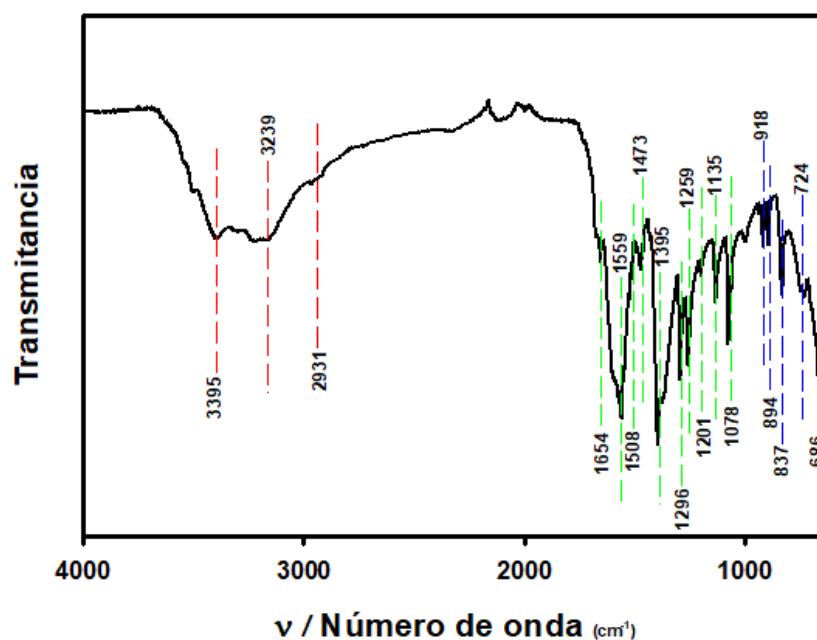


Figura 1.5. Espectro ATR-FTIR para los CNQDs Cys 200,

Las bandas de absorción señaladas con rojo, ubicadas entre números de onda de 2800 a 3500 cm^{-1} , corresponden a los grupos de las aminas primarias y secundarias. Las bandas encontradas entre números de onda de 1050 a 1800 cm^{-1} , señaladas con verde, son correspondientes a las vibraciones asociadas a los enlaces simples y dobles entre carbono y nitrógeno. Por último, las bandas más débiles señaladas con azul y ubicadas entre 650 y 950 cm^{-1} se asocian a las vibraciones ocurridas en los anillos de triazina [24].

Espectrometría de absorción UV-Visible

Se midió el espectro de absorción UV-Visible de los cuatro CNQDs en suspensión acuosa. Los resultados se observan en la Figura 1.6.

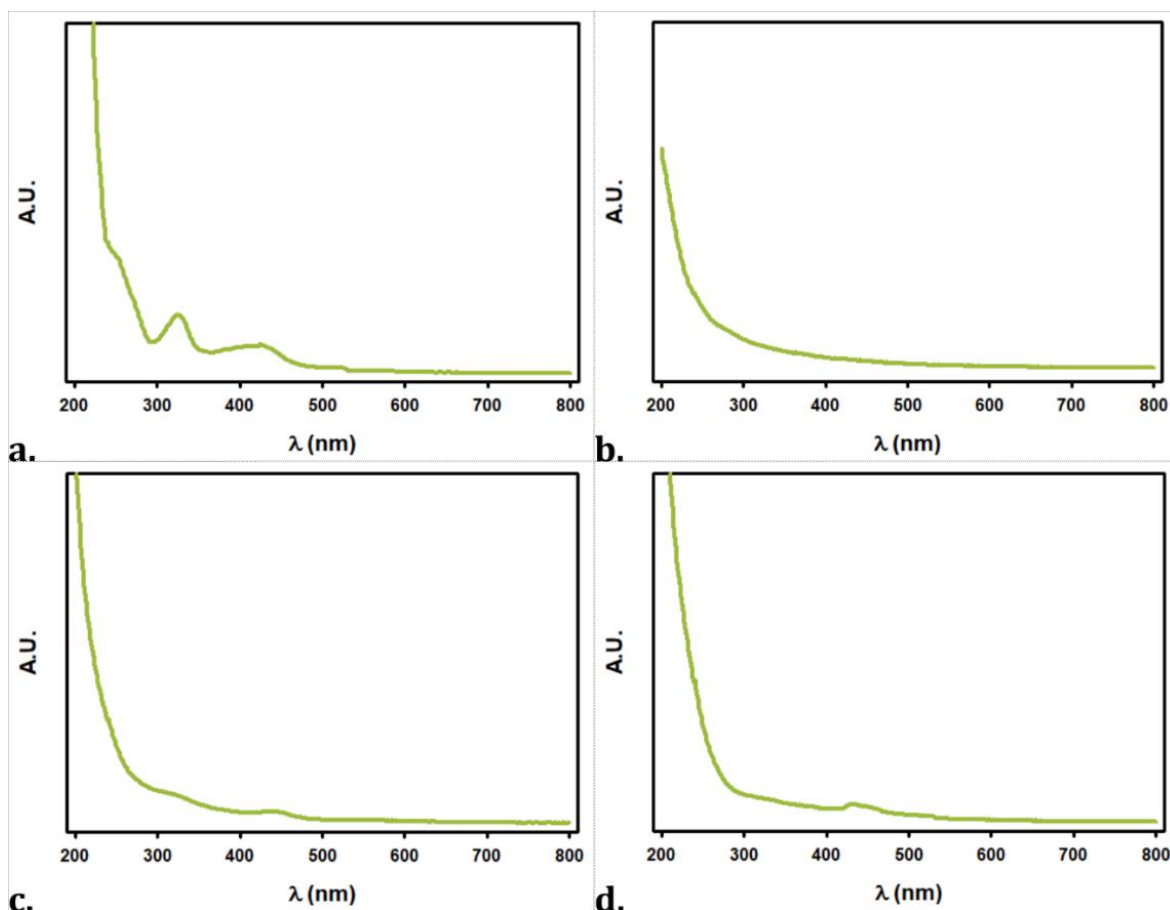


Figura 1.6. Espectros de absorción UV-Visible. (a) CNQDs Urea 180; (b) CNQDs Cys 300; (c) CNQDs Cys 250; y (d) CNQDs Cys 200, Todas las soluciones se prepararon con absorbancia 0,200 para $\lambda = 355$ nm.

En la Figura 1.6a se puede observar un pico de absorción ubicado a 338 nm, lo que implica la presencia de grupos carbonilos o grupos conjugados de carbonilo [5].

En las Figuras 1.6c y 1.6d se observa un pequeño pico de absorción cercano a los 340nm que se asocia a las transiciones $n - \pi^*$. Todos los CNQDs presentan, además, absorción dentro del rango visible.

En todos los CNQDs, a una λ de aproximadamente 250 nm, también se puede observar un pico de absorción típico para la transición $\pi - \pi^*$ (debido a los dominios aromáticos sp^2) [25].

Emisión en UV – Visible

Las suspensiones de partículas presentan fluorescencia amarilla bajo luz ultravioleta de 254 nm y fluorescencia azul cuando son excitadas por luz UV de 350 nm, en concordancia con lo reportado en literatura [7]. Esto se puede observar en las Figuras 1.7a y 7b respectivamente.

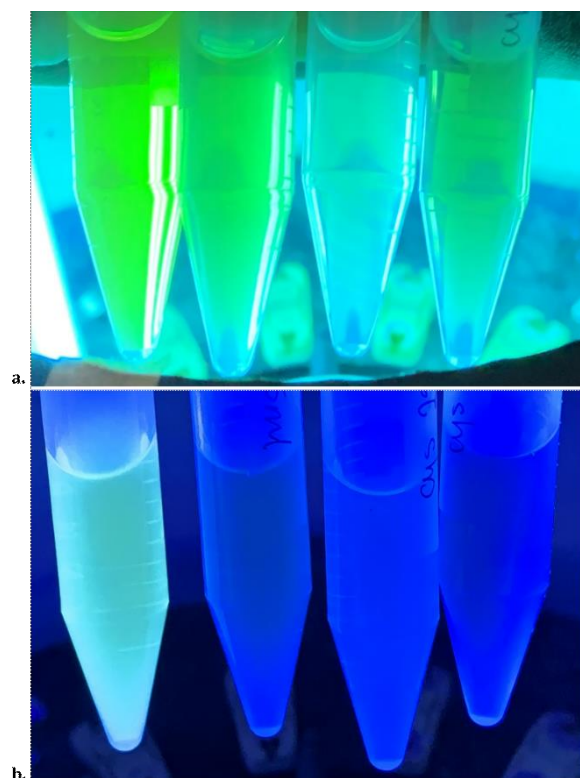


Figura 1.7. Solución de nanopartículas vista bajo luz UV de 254 nm (a) y de 350 nm (b). En ambas imágenes de izquierda a derecha: CNQDs Urea 180; CNQDs Cys 200; CNQDs Cys 250; CNQDs Cys 300,

Matrices de excitación – emisión

Se realizaron matrices de excitación – emisión de las distintas nanopartículas en suspensión acuosa a temperatura ambiente (25°C) de modo de caracterizar las propiedades de emisión de los CNQDs.

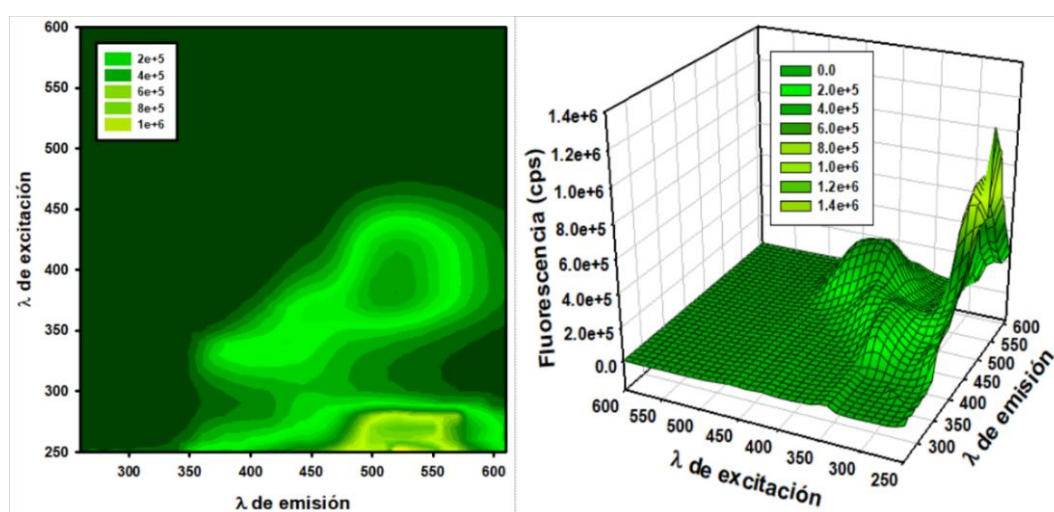


Figura 1.8. Matriz de excitación – emisión para los CNQDs Urea 180 a temperatura ambiente.

Para las nanopartículas Urea 180 (Figura 1.8), podemos observar que sus suspensiones pueden ser excitadas entre 250 y 400 nm, presentando dos picos de emisión con sus máximos centrados a 500 y 550 nm.

Por otro lado, en los CNQDs para los que se utilizó cisteína como precursor, podemos ver que el comportamiento de la fluorescencia es diferente según la temperatura de calcinación utilizada en la síntesis.

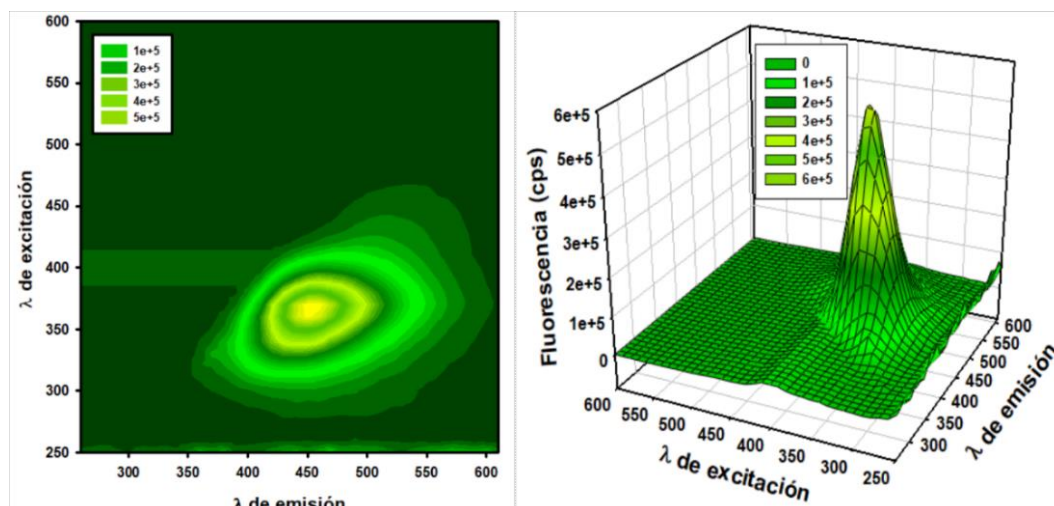


Figura 1.9. Matriz de excitación – emisión para los CNQDs Cys 200 a temperatura ambiente.

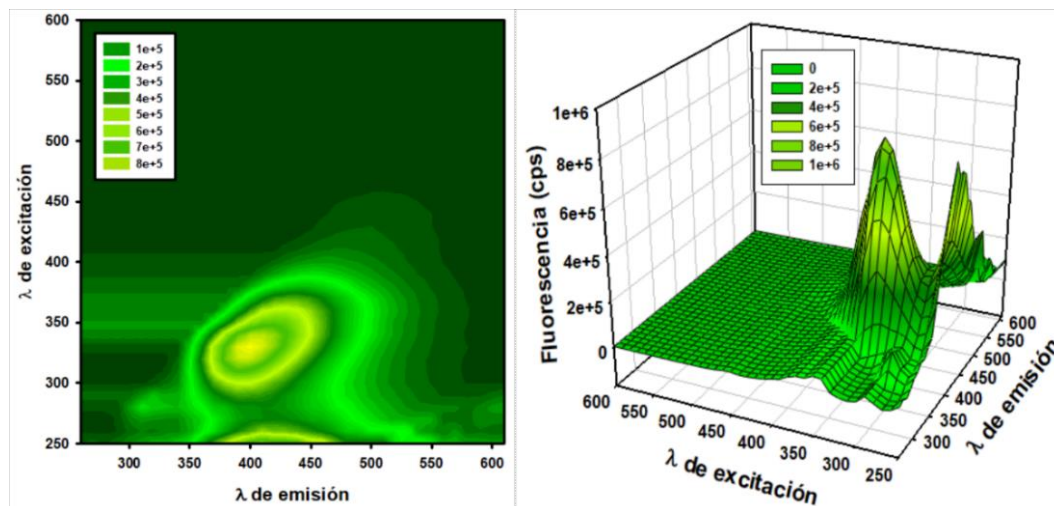


Figura 1.10, Matriz de excitación – emisión para los CNQDs Cys 250 a temperatura ambiente.

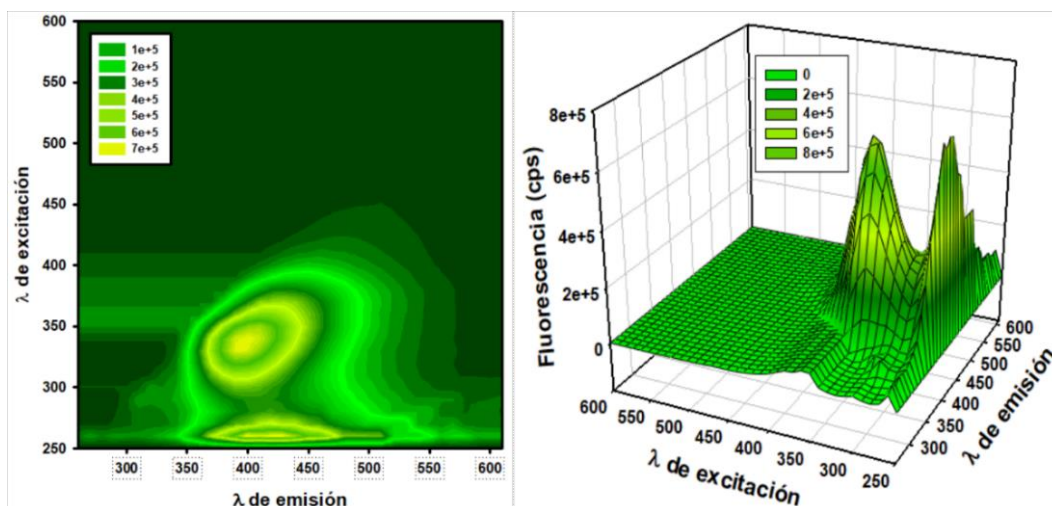


Figura 1.11. Matriz de excitación – emisión para los CNQDs Cys 300 a temperatura ambiente.

En las nanopartículas Cys 200 (Figura 1.9) se puede ver un solo pico de emisión de fluorescencia centrado en aproximadamente 450 nm y que se corresponde a λ_{ex} de 350 – 400 nm.

Cuando observamos la Figura 1.10, correspondiente a los CNQDs Cys 250, vemos que ahora las nanopartículas pueden ser excitadas a más de una longitud de onda, entre 250 y 400 nm; los dos picos de emisión observados se encuentran centrados a 400 y 430 nm.

Por último, los CNQDs Cys 300 (Figura 1.11) presentan la capacidad de ser excitados entre 250 y 400 nm, presentando dos picos de emisión con sus máximos centrados a 400 y 415 nm.

Las mismas medidas de excitación emisión se realizaron a 37°C con el fin de estudiar la emisión en condiciones de temperatura fisiológica. Los resultados se muestran a continuación.

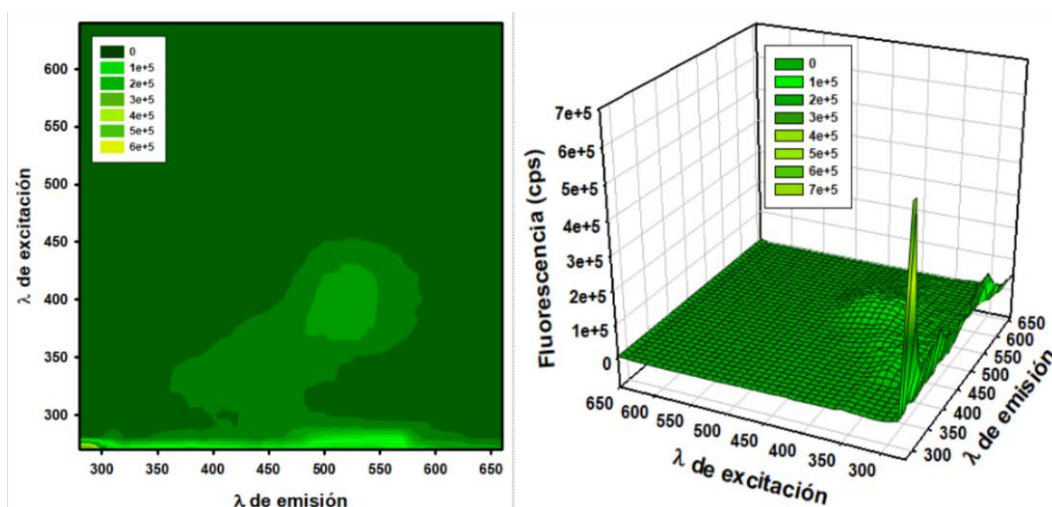


Figura 1.12. Matriz de excitación – emisión para los CNQDs Urea 180 a 37°C.

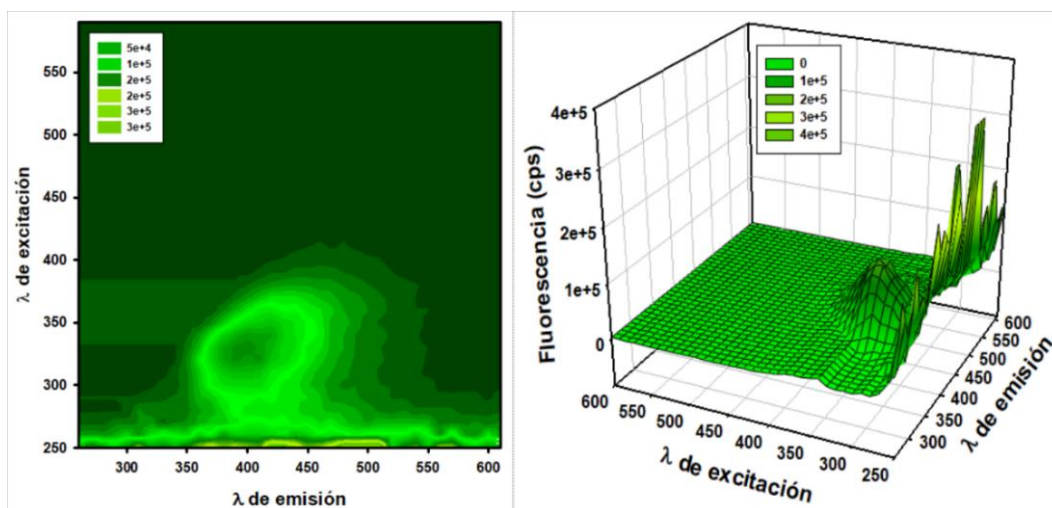


Figura 1.13. Matriz de excitación – emisión para los CNQDs Cys 300 a 37°C.

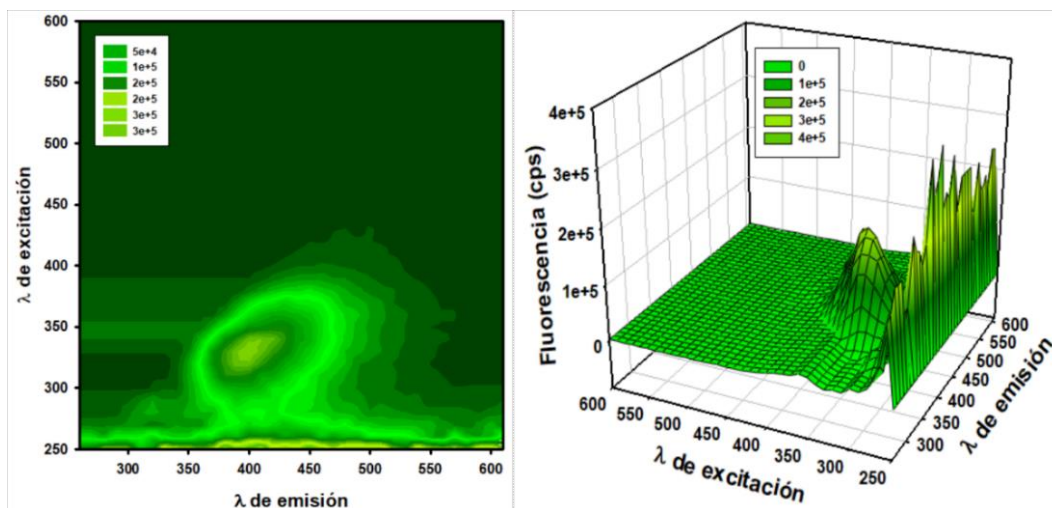


Figura 1.14. Matriz de excitación – emisión para los CNQDs Cys 250 a 37°C.

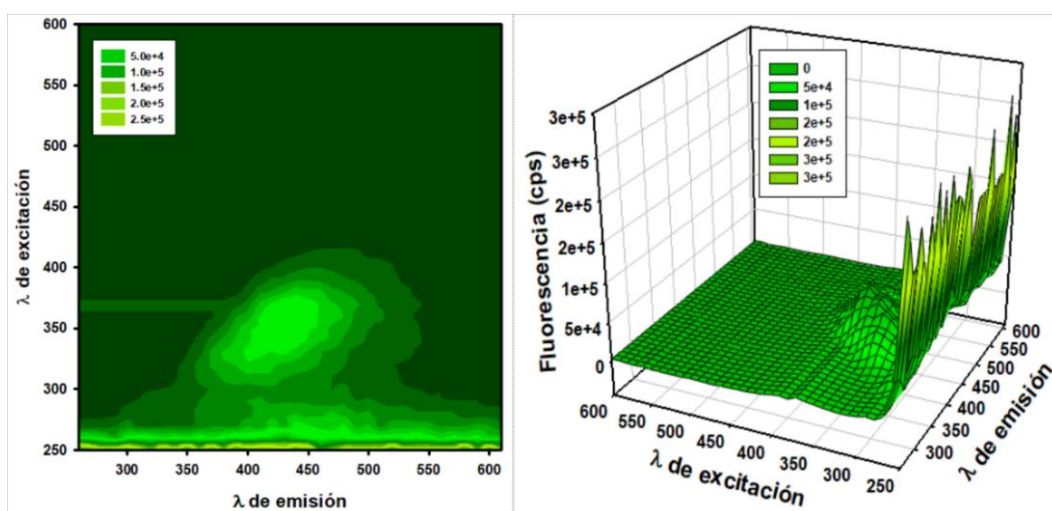


Figura 1.15. Matriz de excitación – emisión para los CNQDs Cys 200 a 37°C.

Como podemos observar en las Figuras 1.12-15, aunque los máximos se mantienen en las mismas longitudes de onda de emisión y excitación, la intensidad de la fluorescencia disminuye.

Resultados similares fueron reportados para quantum dots de grafeno [26], y fueron interpretados como se explica a continuación.

El rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) es la fracción de moléculas que retornan al estado fundamental mediante emisión de fotones. Por lo tanto, dicho rendimiento puede calcularse mediante la ecuación 1.1 [27].

$$\Phi_F = \frac{k_r^S}{k_r^S + k_{nr}^S} \quad \text{Ecuación 1.1}$$

En esta ecuación k_r^S y k_{nr}^S son, respectivamente, las constantes de velocidad de los decaimientos radiativos y no radiativos. La primera es usualmente independiente de la temperatura, mientras que k_{nr}^S depende de la temperatura mediante una distribución de Boltzmann, descrita por la ecuación 1.2.

$$f(E) = A e^{\left(\frac{-E}{kT}\right)} \quad \text{Ecuación 1.2}$$

Donde A es una constante, E es la energía del estado, k es la constante de Boltzmann y T la temperatura absoluta. Así, al aumentar T aumenta k_{nr}^S y por lo tanto disminuye Φ_F [26].

Espectroscopía de fluorescencia resuelta en el tiempo

Se prepararon suspensiones acuosas de los distintos CNQDs con absorbancia 0,050 a la longitud de onda de excitación (λ_{ex}).

En el ensayo, las nanopartículas se excitaron utilizando un Nanoled con longitud de onda de 341 nm. Esta longitud de onda es cercana a la longitud de onda en los distintos CNQDs presentan los máximos de excitación.

A su vez, los tiempos de vida de cada nanopartícula se midieron a las longitudes de onda de emisión (λ_{em}) de fluorescencia máximas; estas están entre 400 y 525 nm para cada una de las partículas.

Las señales de fluorescencia se ajustaron a decaimientos biexponenciales. Los tiempos de vida de fluorescencia de los CNQDs obtenidos se resumen la tabla 1.2.

CNQDs	Tiempo de vida	
Urea 180	1.4 ± 0,1 ns	7.5 ± 0,1 ns
Cys 300	1.2 ± 0,1 ns	5.8 ± 0,1 ns
Cys 250	1.2 ± 0,1 ns	6.8 ± 0,1 ns
Cys 200	1.4 ± 0,1 ns	6.5 ± 0,1 ns

Tabla 1.2. Tiempos de vida de fluorescencia obtenidos para los distintos CNQDs en suspensión a 25°C.

Conclusiones parciales

- Se lograron sintetizar cuatro tipos de CNQDs utilizando y adaptando procesos de síntesis detallados en bibliografía.
- El análisis de ATR-FTIR permitió comprobar que las nanopartículas tienen en su superficie grupos funcionales característicos reportados para los CNQDs.
- A partir del análisis de los espectros de absorción UV – Visible se demostró la presencia de un pico a $\lambda = 250$ nm, asociado a transiciones $\pi - \pi^*$; un pico a $\lambda = 338$ nm, asociado a la presencia de grupos conjugados del carbonilo, y otro a $\lambda = 340$ nm, asociado a transiciones $n - \pi^*$.
- Analizando las matrices de excitación – emisión se concluyó que todas las nanopartículas tienen máximos de excitación y emisión a distintas longitudes de onda, los cuales se mantienen dentro de los rangos de 250 – 450 nm y 350 – 550 nm, respectivamente.
- Se pudieron determinar los tiempos de vida de fluorescencia para los distintos CNQDs sintetizados.

CAPÍTULO II

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOS CNQDS DE
ACTUAR COMO FOTSENSIBILIZADORES

Introducción

Como ya se discutió anteriormente, la terapia fotodinámica ha estado en el foco de investigadores médicos durante los últimos años, debido a que es menos invasiva y produce menos efectos adversos en comparación con otros tratamientos contra el cáncer [28].

La PDT requiere de la presencia de una sustancia fotosensibilizadora y de oxígeno molecular. Bajo las condiciones de irradiación apropiadas, el PS absorbe energía, la cual en parte transfiere al $^3\text{O}_2$, generando especies reactivas del oxígeno; finalmente, los productos citotóxicos generados comienzan una cascada de eventos bioquímicos que culminan en la muerte celular [2].

Los CNQDs pueden ser utilizados como PS y, comparados con otros fotosensibilizadores orgánicos más convencionales, tienen la ventaja de mantenerse estables por más tiempo en el ambiente biológico, así como también presentar niveles muy bajos de citotoxicidad y ser fácilmente metabolizados por los organismos debido a que su composición solo contiene carbono y nitrógeno [1].

En este capítulo se estudió la efectividad de los CNQDs, cuya síntesis y caracterización se describió en el capítulo anterior, para poder ser utilizados como PS. Para esto se analizaron algunas de las propiedades físicas, químicas y fotobiológicas que deben cumplir los PS para su aplicación en PDT. Se evaluó la producción de sustancias reactivas del oxígeno, más específicamente peróxido de hidrógeno y oxígeno singlete. Además se ensayó la citotoxicidad de los distintos CNQDs en condiciones de oscuridad y luz (los mismos no deben ser tóxicos para los tejidos blancos en oscuridad en las concentraciones utilizadas [8]).

Detección de especies reactivas del oxígeno

• Medidas de cuantificación de Peróxido de Hidrógeno:

Se evaluó la capacidad de generación de peróxido de hidrogeno en soluciones acuosas de las distintas nanopartículas al ser irradiadas con radiación de longitud de onda adecuada. La absorbancia a la λ_{ex} fue 0,500.

Las suspensiones se colocaron en un reactor de cuarzo y fueron irradiadas en un fotorreactor Rayonet con 8 lámparas de 354.4 nm durante 7 minutos 30 segundos.

Luego, se procedió como se explica en la sección de Materiales y Métodos.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

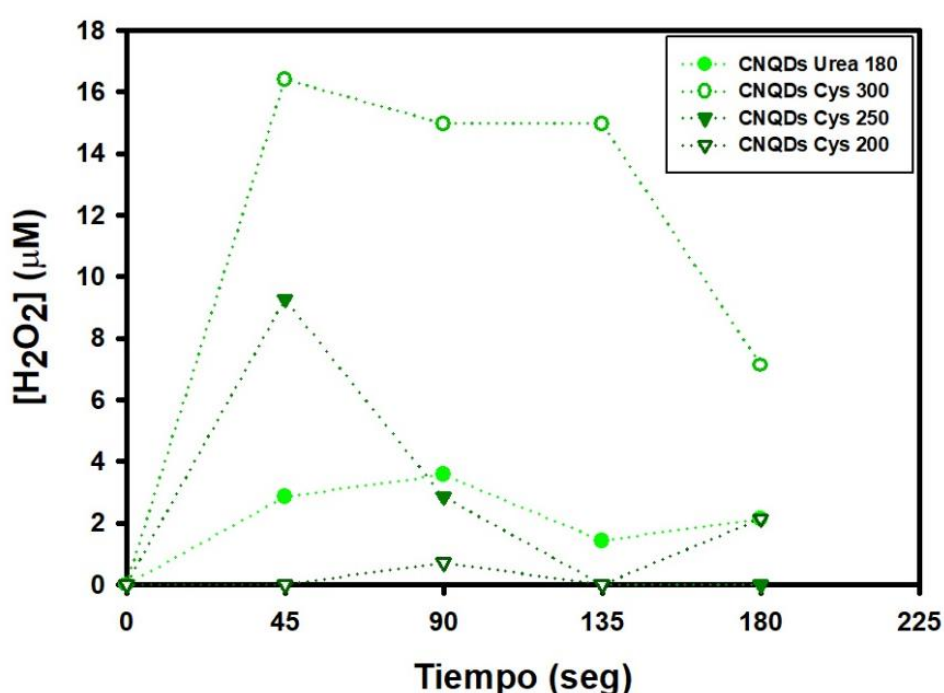


Figura 2.1. Cuantificación de H_2O_2 en los distintos CNQDs a distintos tiempos.

Como podemos observar en la Figura 2.1, todas las partículas generan H_2O_2 . Los CNQDs que presentan mayor producción son los Cys 300.

En todos los casos, luego de alcanzar un máximo, se observa una disminución en la concentración media de H_2O_2 . Ese comportamiento podría deberse a la fotólisis de H_2O_2 a la longitud de onda utilizada (354.4 nm) que produce radicales OH^\bullet con un rendimiento cuántico de 1 a temperatura ambiente (25°C) [29]. Sin embargo, el coeficiente de absorción molar del H_2O_2 a 350 nm es muy bajo [30], por lo que es probable que esta no sea la principal causa de su consumo. Alternativamente, el consumo de H_2O_2 después de

cierto tiempo podría deberse a que los CNQDs catalicen la degradación del peróxido, como lo hacen los nanomateriales de plata [31].

- *Medidas de fosforescencia de oxígeno singlete a 1270 nm:*

La preparación de las muestras se detalla en la sección de Materiales y Métodos.

Se realizaron tres medidas de fosforescencia para cada suspensión y los resultados fueron promediados.

Como sustancia de referencia se utilizó el fotosensibilizador riboflavina (Rf), también conocido como vitamina B2. Cuando la Rf es irradiada, transfiere energía al estado basal del oxígeno originando la formación de oxígeno singlete con un rendimiento cuántico [Φ_{Δ}] de 0,54 [32].

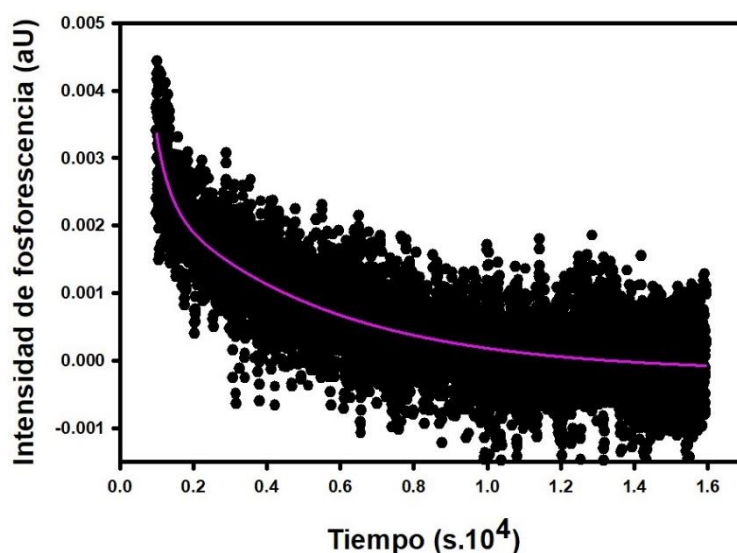


Figura 2.2. Detección de oxígeno singlete mediante fosforescencia resuelta en el tiempo a 1270 nm de Riboflavina.

La Figura 2.2 muestra un decaimiento típico de fosforescencia de oxígeno singlete. Señales similares se obtuvieron para los distintos CNQDs, excepto para Urea 180 para el que no se pudo registrar la fosforescencia a 1270 nm. Todas las señales se ajustaron a un decaimiento exponencial con tiempos de vida de $31 \pm 10 \mu\text{s}$ que, como era de esperar, es un valor intermedio entre los reportados para D₂O (62 μs) y H₂O (3 μs) [33].

De las medidas de fosforescencia de oxígeno singlete resueltas en el tiempo, concluimos que, para el nivel de detección de nuestro equipo, exceptuando los CNQDs de Urea 180, el resto de nuestras nanopartículas son capaces de producir oxígeno singlete.

La señal de fosforescencia a 1270 nm inmediatamente después del pulso del láser (I_0) es directamente proporcional al rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2$ (Φ_{Δ}) y a la intensidad de luz absorbida por la muestra calculada como el producto entre la energía del pulso del láser (E_1) y la fracción de luz absorbida por la muestra ($1-10^{-A}$), siendo A la

absorbancia de la muestra a la longitud de onda de emisión de láser, en nuestro caso 355 nm (Ecuación 2.1).

$$I_0 \propto \Phi_{\Delta} \times (1 - 10^{-A}) \times E_l \quad \text{Ecuación 2.1}$$

Para poder averiguar el rendimiento cuántico de producción de esta especie para los distintos CNQDs, se trabajó con muestras de la misma absorbancia a 355 nm ($A = 0,50 \pm 0,02$) de los nanomateriales y de referencia, empleando en todos los casos la misma energía de láser (10 mJ/pulso). En estas condiciones I_0 es directamente proporcional a Φ_{Δ} y por lo tanto, conociendo Φ_{Δ} para la referencia [32], pueden calcularse los valores de Φ_{Δ} de las muestras (ver Tabla 2.1).

CNQDs	Φ_{Δ}
Urea 180	< 0,02
Cys 300	0,03
Cys 250	0,28
Cys 200	0,38

Tabla 2.1. Rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) para la Rf y los distintos CNQDs.

Como para los CNQDs Urea 180 no pudo detectarse, con nuestro equipo, la fosforescencia de 1O_2 , estimamos que el rendimiento cuántico es menor a 0,02. Para el resto de las nanopartículas, encontramos rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete considerables.

Citotoxicidad celular

- *Ensayo de reducción de MTT*

En primer lugar, se realizaron ensayos en células HeLa no irradiadas en presencia de distintas concentraciones de los CNQDs (0 a 1 mg/mL) de forma de analizar cuáles son las concentraciones óptimas a utilizar en los posteriores ensayos de irradiación celular, considerando que las nanopartículas no deben generar toxicidad celular en oscuridad.

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de ANOVA unidireccional sobre aquellos valores que presentaron una pérdida del más del 10% de la viabilidad, con prueba postoperatoria de Fisher con un nivel de confianza del 95%. Se utilizó el p-value estilo GP, mostrado en la Tabla 2.2.

Notación	p-value
ns	> 0,12345
*	> 0,0332
**	> 0,0021
***	> 0,0002
****	> 0,0001

Tabla 2.2. Notación GP para el p-value.

En la Figura 2.3 se muestran los resultados obtenidos al comparar las células tratadas con el control, células a las que no se les aplicó ningún tratamiento.

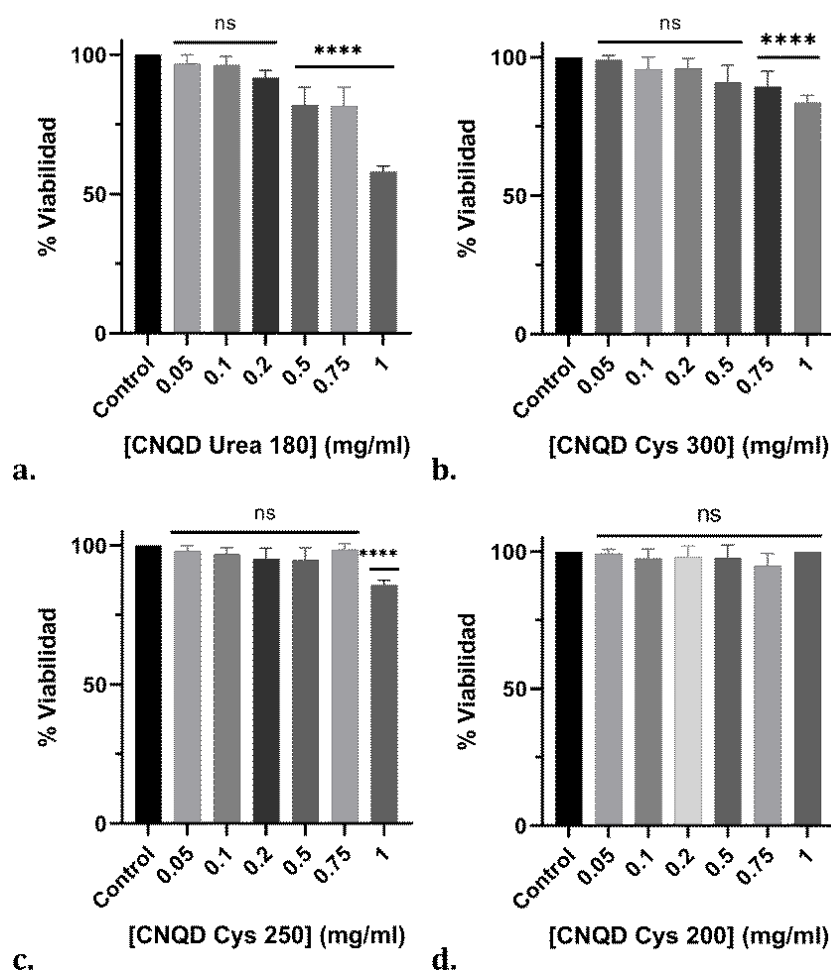


Figura 2.3. Histograma del ensayo MTT en células HeLa no irradiadas tratadas con distintas concentraciones de CNQDs Urea 180 (a), CNQDs Cys 300 (b), CNQDs Cys 250 (c) y CNQDs Cys 200 (d), en el medio de incubación.

Las células tratadas con concentraciones de CNQDs de 1 mg/mL fueron las que presentaron mayores diferencias en viabilidad respecto a las células control; por esta

razón, para los ensayos de irradiación posteriores se decidió trabajar con células tratadas con concentraciones de nanopartículas hasta 0,75 mg/mL.

Para los ensayos en los que las células HeLa fueron irradiadas, se utilizaron dos lámparas *RPR-3500 A* con emisión centrada en 350 nm.

La realización de los ensayos de irradiación procedió de la siguiente forma: las células fueron incubadas con suspensiones de los nanomateriales en medio de cultivo durante 24 horas; transcurrido ese tiempo, las células se lavaron con medio fresco para eliminar los CNQDs que no hayan sido internalizados y, posteriormente, las células se irradiaron durante dos horas. El medio de cultivo utilizado en esta etapa fue el MEM sin rojo de fenol debido a que este compuesto presenta absorción en la longitud de onda utilizada y podía interferir con los ensayos [34].

En la Figura 2.4 se observan la comparación estadística de las células sin irradiar (negro) y las células irradiadas (gris) durante dos horas entre sí.

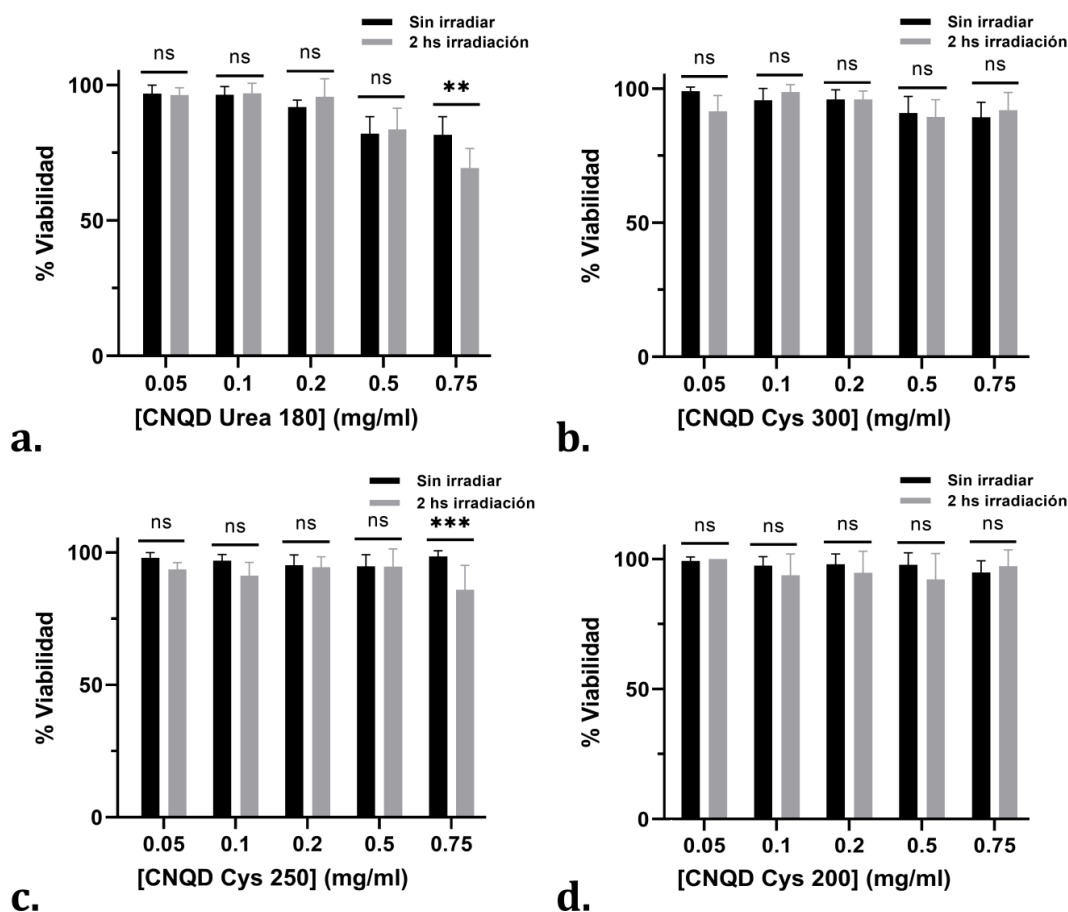


Figura 2.4. Histograma del ensayo MTT comparando células no irradiadas y células irradiadas durante 2 hs; tratadas con distintas concentraciones de CNQDs Urea 180 (a); CNQDs Cys 300 (b); CNQDs Cys 250 (c) y CNQDs Cys 200 (d), en el medio de incubación.

El análisis estadístico de estas muestras se realizó con una prueba de ANOVA bidireccional con prueba postoperatoria de Fisher manteniendo el intervalo de confianza en 95% y usando, nuevamente, el p-value estilo GP.

En las Figuras 2.4b y 2.4d se puede observar que no hay diferencias significativas para ninguna de las concentraciones trabajadas cuando se cambian las condiciones de incubación (irradiadas o no irradiadas). Esto se interpreta como que la citotoxicidad de las nanopartículas Cys 300 y Cys 200 no cambia en presencia de luz.

Por otro lado, en la Figura 2.4a, correspondiente a los CNQDs Urea 180, se observa que hay diferencia en el % de viabilidad de las células HeLa para las dos condiciones de irradiación, cuando la incubación se realizó con una concentración de nanopartículas de 0,75 mg/mL. La viabilidad disminuyó del 81,62% en la condición de no irradiación al 69,35% cuando las células se irradiaron durante dos horas.

Por último, en la Figura 2.4c, donde las células se trataron con CNQDs Cys 250, también se nota una diferencia significativa en la viabilidad celular para la concentración 0,75mg/ml. Las células pasaron de tener una viabilidad del 98,38% cuando no fueron irradiadas, al 85,85% cuando se irradian por 2 horas.

Estos resultados muestran, en las condiciones de trabajo, un efecto fototóxico para los CNQDs Urea 180 y Cys 250, Estas últimas fueron las que presentaron el mayor valor de Φ_{Δ} en suspensión acuosa y una baja producción de H_2O_2 , por lo que podríamos especular que inducen la muerte celular mediante un mecanismo de Tipo II.

En el caso de Urea 180, no pudo determinarse la producción de 1O_2 por irradiación de sus suspensiones, por lo que estimamos que su Φ_{Δ} debería ser menor al 2%. Además, estos CNQDs también generaron bajas concentraciones de H_2O_2 . Probablemente, la mayor fototoxicidad relativa de los mismos en comparación con el resto de los CNQDs se deba a que su incorporación intracelular se vea favorecida.

Conclusiones parciales

- Todas las nanopartículas presentan, en mayor o menor medida, generación de H_2O_2 por irradiación. Los CNQDs Cys 300 son quienes tienen mayor producción.
- Las nanopartículas que tienen mayor generación de $^1\text{O}_2$ (Cys 200 y Cys 250) generan bajas concentraciones de H_2O_2 por irradiación.
- Los CNQDs Urea 180 presentan baja producción de peróxido de hidrógeno y, además, no fue posible detectar producción de oxígeno singlete con el equipo utilizado.
- Se encontraron diferencias en el % de viabilidad celular en oscuridad para Urea 180 y Cys 300, para concentraciones superiores a 0,50 mg/mL.
- La citotoxicidad de los CNQDs Cys 200 y Cys 300 no cambia en presencia o ausencia de irradiación para ninguna de las concentraciones estudiadas.
- Se encontraron efector fototóxicos para los CNQDs Urea 180 y Cys 250 cuando se incuban en concentraciones de 0,75 mg/mL.

CAPÍTULO III

ESTUDIO DE LOS CNQDS COMO POTENCIADORES DEL
EFECTO FOTOSENSIBILIZADOR DEL TMPYP

Introducción:

Como ya se describió en la introducción, el TMPyP pertenece a la familia de las porfirinas, macrociclos aromáticos que forman la mayoría de los PS aprobados para aplicaciones biomédicas.

El TMPyP ha sido ampliamente estudiado en las últimas décadas y se ha descrito como un PS prometedor para la PDT, principalmente debido a su habilidad de generar ROS luego de su activación lumínica [8].

Diferentes grupos de investigación han analizado la localización subcelular del TMPyP basándose en su emisión de fluorescencia roja y han descubierto que, aunque el compuesto se acumula en lisosomas y en el aparato de Golgi, luego de ser activado con luz, se re en el núcleo celular [8].

La Figura 3.1 muestra el espectro de absorción para el TMPyP. Se puede observar que la absorbancia máxima está a 422 nm en la llamada banda B, y que a longitudes de onda mayores el espectro tiene cuatro picos menos intensos a los que se los llama picos Q [8].

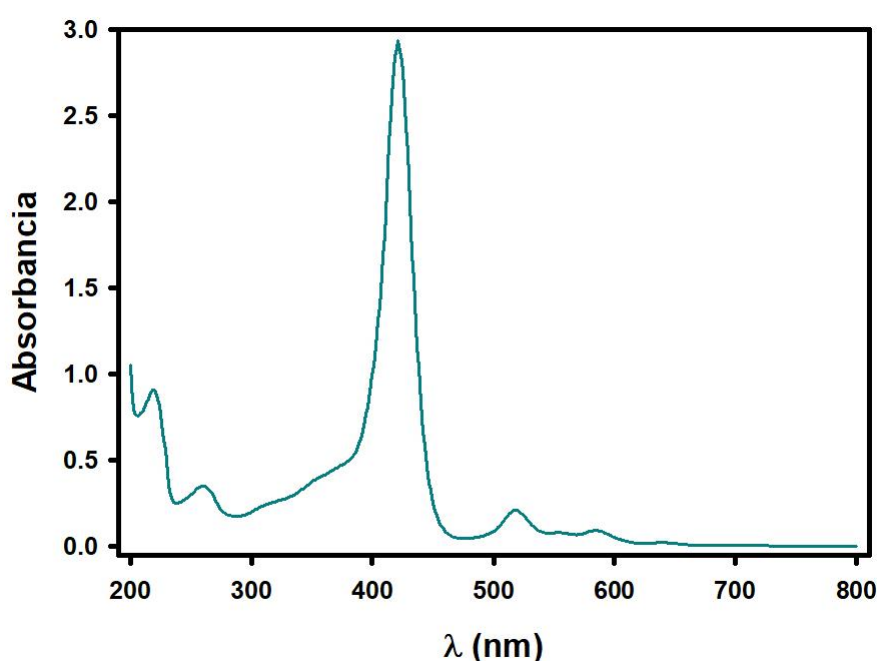


Figura 3.1. Espectro de absorción del TMPyP.

Por otro lado, los CNQDs, además de ser capaces de actuar como donores de energía transfiriendo su energía a otras moléculas, son capaces, debido a su tamaño de unos pocos nanómetros, de pasar por los poros nucleares y penetrar el núcleo celular [4][35].

Combinando las características que poseen el TMPyP y los CNQDs, y teniendo en cuenta que los CNQDs emiten en la región espectral en la que absorbe el TMPyP, decidimos investigar, mediante ensayos de fluorescencia, la posible transferencia de

energía desde los estados excitados de los CNQDs hacia el TMPyP y hacer estudios preliminares de la capacidad de los CNQDs de actuar como potenciadores de la actividad fotosensibilizadora del TMPyP mediante flash – fotólisis.

A continuación, se detallan los resultados obtenidos.

Espectrometría de absorción UV-Visible

Se registraron espectros de absorción UV-Visible a soluciones acuosas diluidas de los distintos CNQDs, TMPyP y de las mezclas de las nanopartículas con el TMPyP (Figuras 3.2-5).

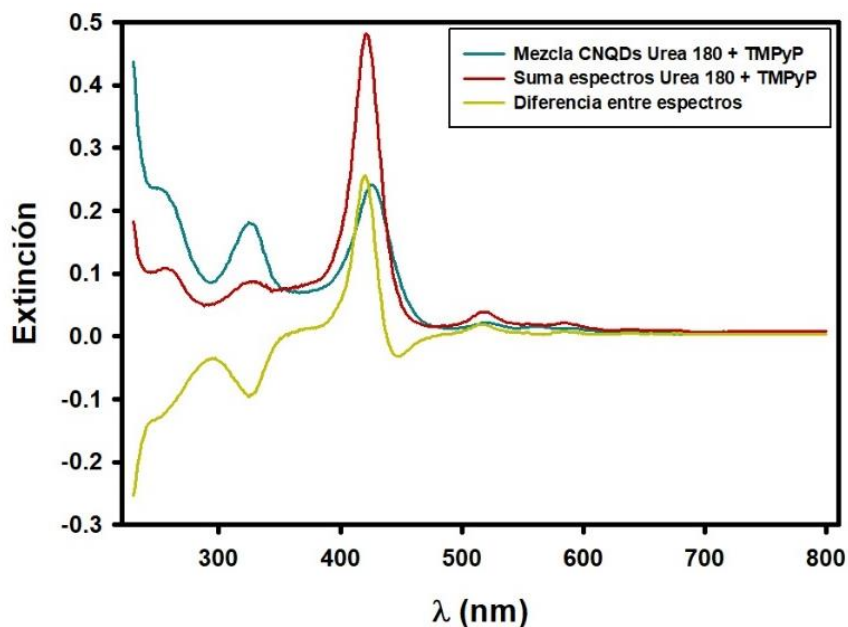


Figura 3.2. Espectro UV-Visible para una mezcla de CNQDs Urea 180 + TMPyP, la suma de los espectros individuales y la diferencia entre la mezcla y la suma.

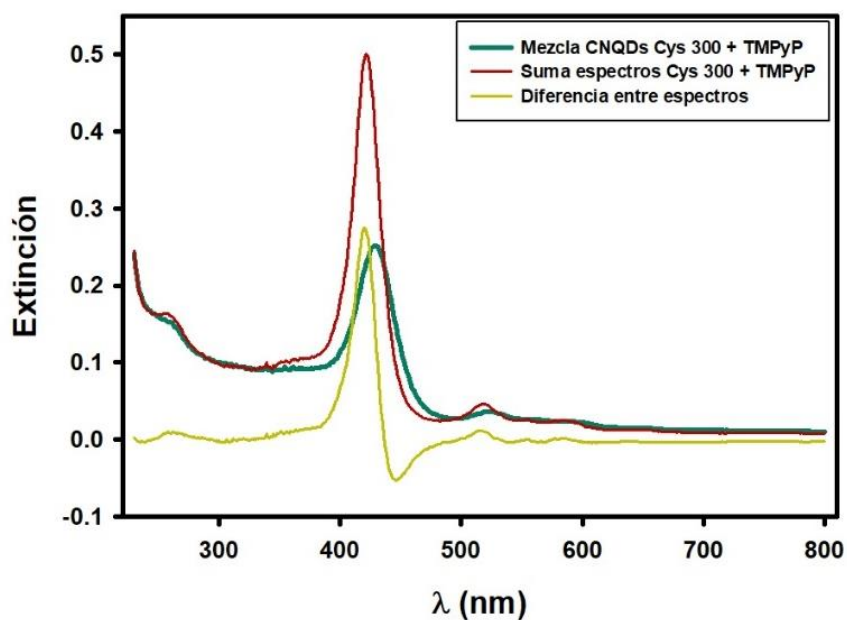


Figura 3.3. Espectro UV-Visible para una mezcla de CNQDs Cys 300 + TMPyP, la suma de los espectros individuales y la diferencia entre la mezcla y la suma.

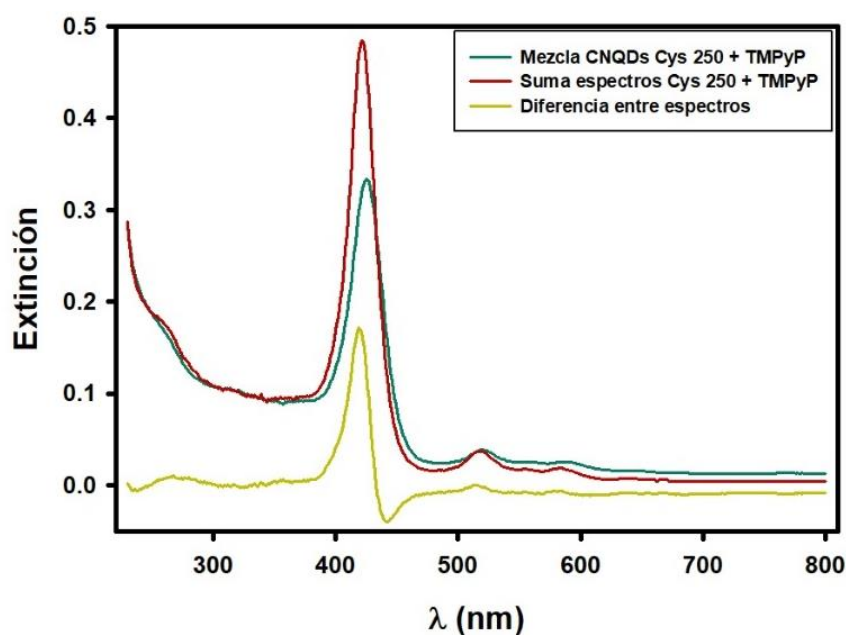


Figura 3.4. Espectro UV-Visible para una mezcla de CNQDs Cys 250 + TMPyP, la suma de los espectros individuales y la diferencia entre la mezcla y la suma.

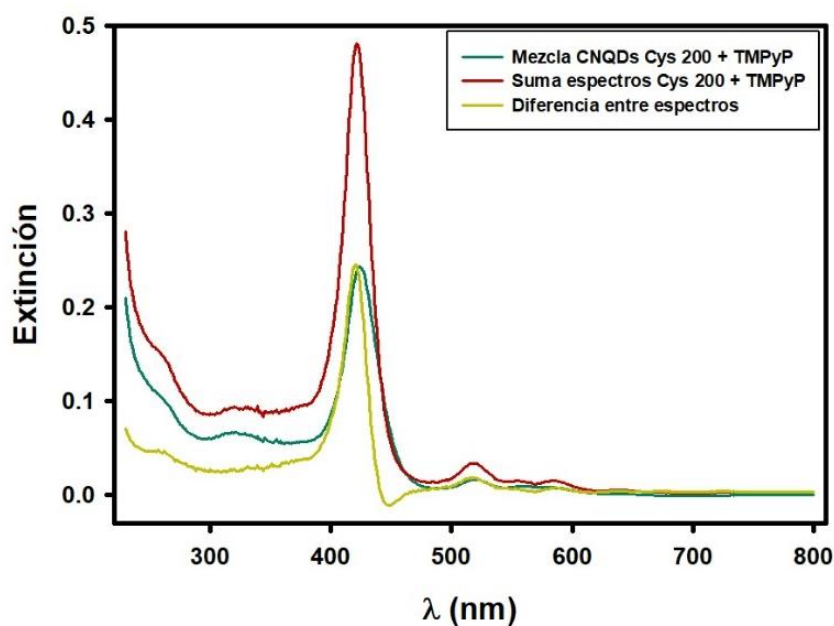


Figura 3.5. Espectro UV-Visible para una mezcla de CNQDs Cys 200 + TMPyP, la suma de los espectros individuales y la diferencia entre la mezcla y la suma.

En las Figuras 3.2-5 se puede observar que los espectros de absorción de las mezclas de las nanopartículas con el TMPyP (azul) difieren respecto a la suma de los espectros individuales de las nanopartículas y el PS (rojo). Las Figuras muestran además, dichas diferencias en amarillo.

La diferencia observada entre los espectros de la mezcla y la suma de los espectros individuales, evidencia que existe alguna interacción entre las nanopartículas y el TMPyP

en el estado fundamental. Esta interacción implicaría la adsorción del PS sobre los CNQDs (Figura 3.6).

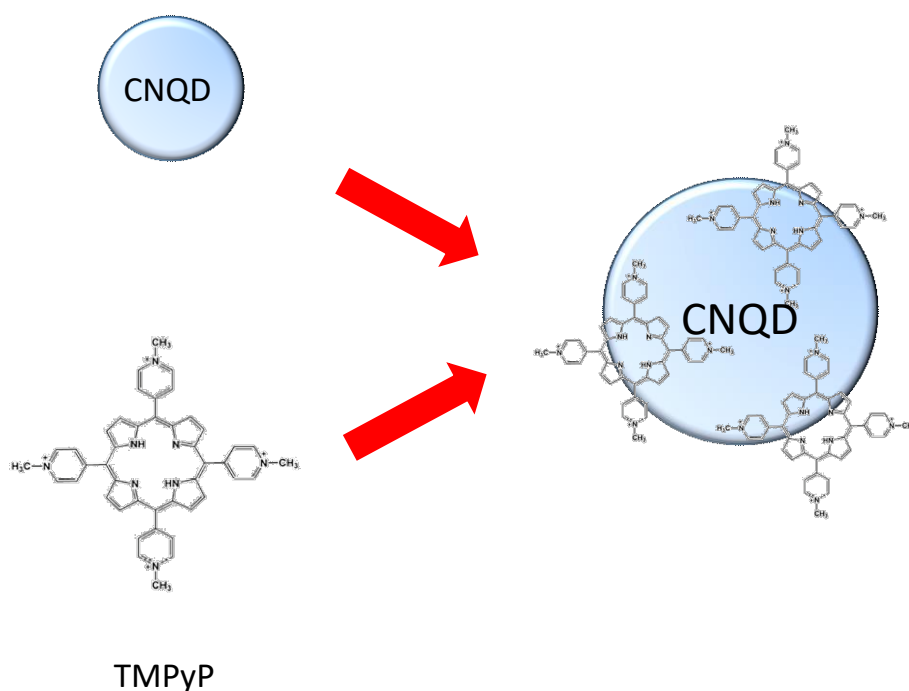


Figura 3.6. Esquema representativo de la adsorción de TMPyP sobre los CNQDs.

Espectroscopía de emisión

• *Espectroscopía de fluorescencia en estado estacionario*

Se estudió la fotoluminiscencia de los CNQDs, en presencia y ausencia de TMPyP. Debido a que el espectro de absorción del TMPyP se superpone con el espectro de fluorescencia de las nanopartículas, se investigó si podría ocurrir un mecanismo de transferencia de energía desde los estados excitados de los CNQDs al TMPyP.

Para realizar las distintas medidas, se prepararon suspensiones acuosas de los CNQDs de absorbancia 0,050 a la λ_{ex} en ausencia y presencia de TMPyP a una concentración tal que la absorbancia del fotosensibilizador a la longitud de onda utilizada fuera diez veces menor que la de las nanopartículas. Se eligieron distintos valores de λ_{ex} para cada CNQDs a partir de las matrices excitación – emisión mostradas en el Capítulo I. En todos los casos λ_{ex} fue menor a 400 nm. Como puede verse en la Figura 3.1, la absorbancia del TMPyP a λ menores o iguales a 400 nm disminuye significativamente; de esta manera nos aseguramos que la luz sea principalmente absorbida por los CNQDs.

Para poder analizar correctamente los resultados, se debió descartar el posible efecto de filtro interno que generen los agregados de CNQDs sobre la fluorescencia del TMPyP o viceversa, tanto para la luz de excitación como de emisión. Estos efectos se eliminaron corrigiendo la intensidad registrada a las distintas λ_{em} utilizando la Ecuación 3.1 [36]:

$$F_{cor} = F_{obs} 10^{\left[\frac{A_{exc} + A_{em}}{2}\right]} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Donde F_{cor} y F_{obs} son las intensidades de emisión de fluorescencia corregidas y observadas respectivamente, A_{exc} y A_{em} son las absorbancias de las nanopartículas a las longitudes de onda de emisión y excitación utilizadas; y el factor 2 se utiliza suponiendo que la absorción y la emisión ocurren en el centro de la celda de cuarzo utilizada.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

En las Figuras 3.7-9, correspondientes a las nanopartículas Urea 180, Cys 250 y Cys 300, se puede ver que cuando se emplean λ_{ex} menores a 300 nm, la intensidad de fluorescencia de las mezclas es notablemente menor a la de las soluciones de los CNQDs (quenching de fluorescencia de los CNQDs por TMPyP).

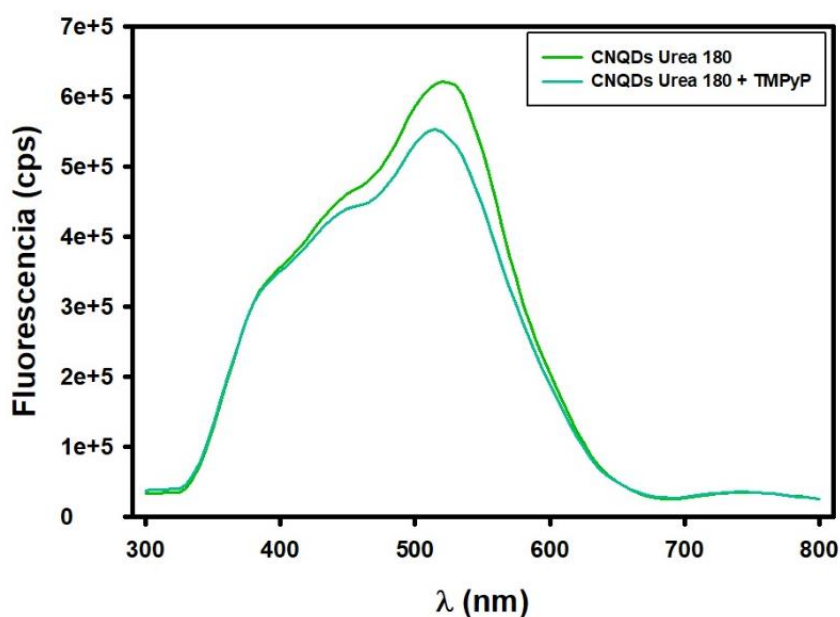


Figura 3.7. Espectro de emisión de fluorescencia de los CNQDs Urea 180 y mezcla cuando son excitados a 272 nm.

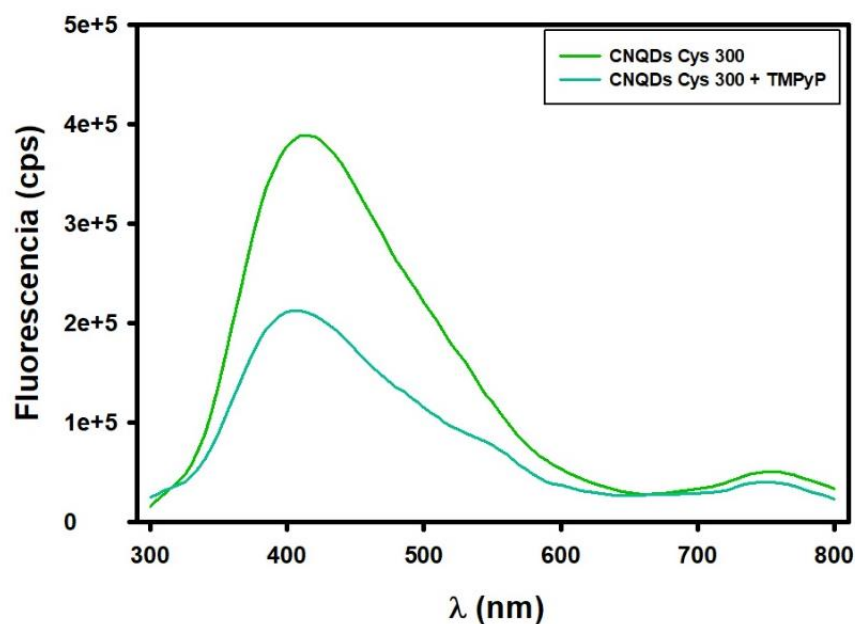


Figura 3.8. Espectro de emisión de fluorescencia de los CNQDs Cys 300 y mezcla cuando son excitados a 250 nm.

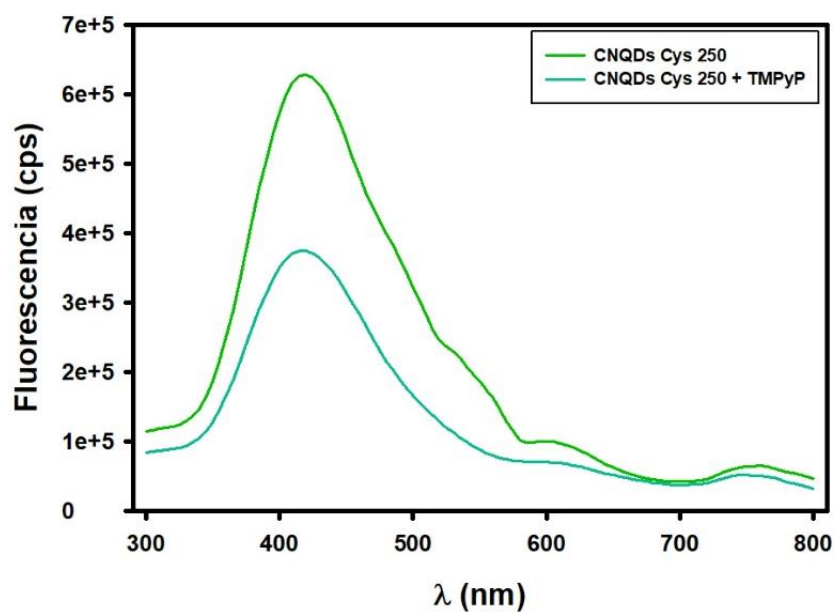


Figura 3.9. Espectro de emisión de fluorescencia de los CNQDs Cys 250 y mezcla cuando son excitados a 250 nm.

Cuando se emplearon λ_{ex} entre 300 y 400 nm, también se observó quenching de fluorescencia de los CNQDs Cys 200, Cys 250 y Cys 300 por TMPyP, pero este fue de mucha menor magnitud (Figuras 3.10-12).

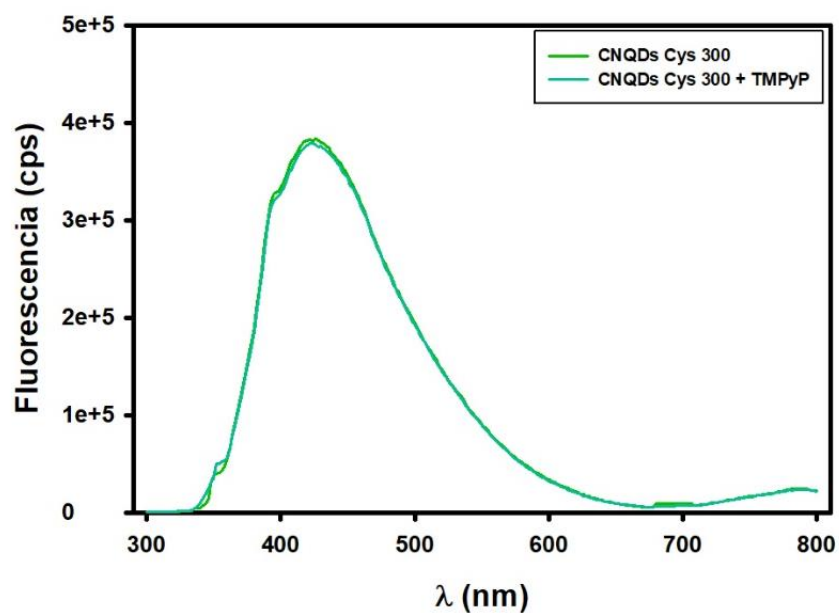


Figura 3.10, Espectro de emisión de fluorescencia de los CNQDs Cys 300 y mezcla cuando son excitados a 346 nm.

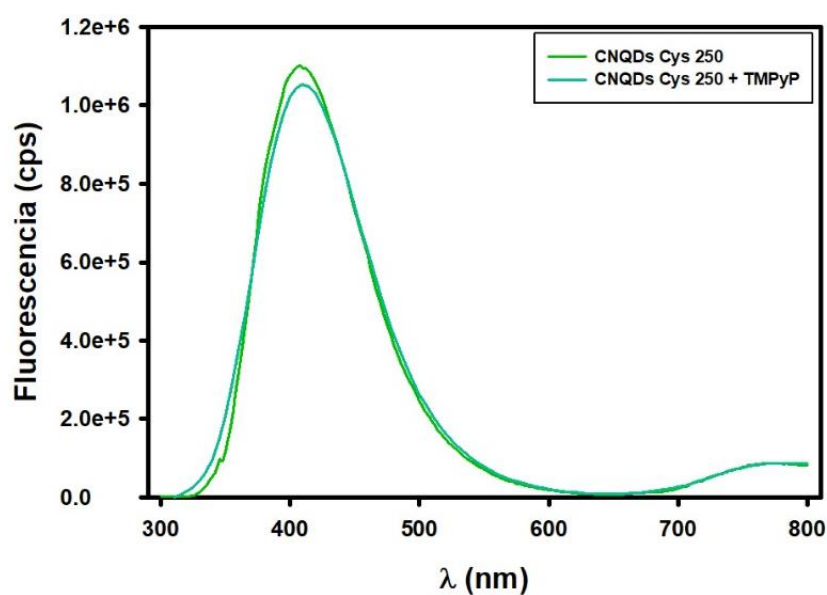


Figura 3.11. Espectro de emisión de fluorescencia de los CNQDs Cys 250 y mezcla cuando son excitados a 337 nm.

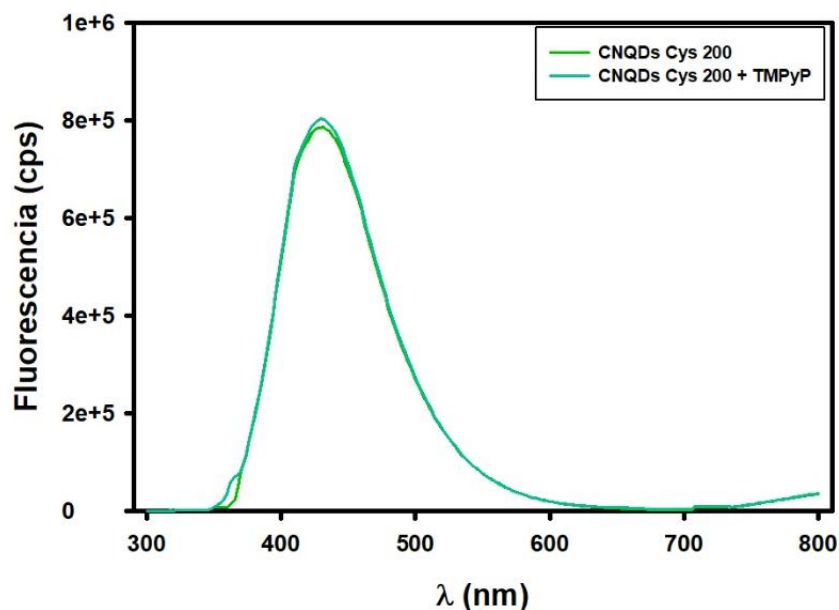


Figura 3.12. Espectro de emisión de fluorescencia de los CNQDs Cys 200 y mezcla cuando son excitados a 360 nm.

En ninguna de las mezclas analizadas se observó que por excitación de los CNQDs aparezca la emisión de TMPyP, por lo que se descarta, en nuestras condiciones experimentales, la transferencia de energía desde los estados excitados de los CNQDs al TMPyP.

- *Espectroscopía de fluorescencia resuelta en el tiempo*

Los ensayos se realizaron excitando las mezclas con dos nanoleds de $\lambda_{\text{ex}} = 341$ nm y 388 nm. Estas longitudes de onda fueron elegidas en base a la cercanía que presentan a los máximos de excitación de los CNQDs y el TMPyP, respectivamente. Si bien los efectos más notables de quenching de fluorescencia de los CNQDs por el TMPyP se observaron para longitudes de onda de excitación menores a 300 nm, no contamos con nanoleds en ese rango de emisión.

Se prepararon suspensiones acuosas de las nanopartículas a concentraciones tales que sus absorbancias a $\lambda_{\text{ex}} = 341$ nm fueron 0,050 en ausencia y presencia de TMPyP. Se tuvo en cuenta que la absorbancia del PS a 341 nm fuera 0,005, es decir 10 veces menor que la de los CNQDs para que la luz fuera absorbida principalmente por los CNQDs.

En otra serie de experimentos realizados a $\lambda_{\text{ex}} = 388$ nm, la absorbancia del PS fue de 0,050, y cuando los CNQDs estuvieron presentes su absorbancia a 388 nm fue de 0,005, para lograr la excitación principalmente del TMPyP.

La fluorescencia de los CNQDs presentó un decaimiento biexponencial, mientras que el del TMPyP fue monoexponencial. En la segunda y tercera columna de la Tabla 3.1, se observan los dos tiempos de vida de fluorescencia obtenidos para una $\lambda_{\text{ex}} = 341$ nm, en

donde emiten fluorescencia las nanopartículas; en la cuarta columna, la excitación se realizó con $\lambda_{\text{ex}} = 388 \text{ nm}$, y por lo tanto quien emite fluorescencia es el TMPyP.

Muestra	Tiempo de vida (τ)		
	$\lambda_{\text{ex}} = 341 \text{ nm}$		$\lambda_{\text{ex}} = 388 \text{ nm}$
TMPyP			$5.2 \pm 0,1 \text{ ns}$
CNQDs Urea 180	$1.4 \pm 0,1 \text{ ns}$	$7.5 \pm 0,1 \text{ ns}$	
CNQDs Cys 300	$1.2 \pm 0,1 \text{ ns}$	$5.8 \pm 0,1 \text{ ns}$	
CNQDs Cys 250	$1.2 \pm 0,1 \text{ ns}$	$6.8 \pm 0,1 \text{ ns}$	
CNQDs Cys 200	$1.4 \pm 0,1 \text{ ns}$	$6.5 \pm 0,1 \text{ ns}$	
CNQDs Urea 180+ TMPyP	$1.5 \pm 0,1 \text{ ns}$	$7.9 \pm 0,1 \text{ ns}$	$5.9 \pm 0,1 \text{ ns}$
CNQDs Cys 300 + TMPyP	$1.1 \pm 0,1 \text{ ns}$	$5.4 \pm 0,1 \text{ ns}$	$7.0 \pm 0,1 \text{ ns}$
CNQDs Cys 250 + TMPyP	$1.2 \pm 0,1 \text{ ns}$	$7.0 \pm 0,1 \text{ ns}$	$5.7 \pm 0,1 \text{ ns}$
CNQDs Cys 200 + TMPyP	$1.3 \pm 0,1 \text{ ns}$	$6.4 \pm 0,1 \text{ ns}$	$5.9 \pm 0,1 \text{ ns}$

Tabla 3.1. Tiempos de vida de fluorescencia (τ) del TMPyP, los CNQDs y las mezclas de TMPyP con los CNQDs. Datos de la segunda y tercera columna corresponden a los τ del decaimiento biexponencial de los CNQDs obtenido con $\lambda_{\text{ex}} = 341 \text{ nm}$; en la tercera columna se muestra el τ de TMPyP empleando $\lambda_{\text{ex}} = 388 \text{ nm}$.

Se observó que los τ de las mezclas se mantuvieron iguales o con pequeñas variaciones respecto a las suspensiones de CNQDs. Para Cys 200 y Cys 250 los valores obtenidos en ausencia y presencia de TMPyP fueron coincidentes. Para Urea 180 y Cys 300, la presencia del PS produjo un pequeño cambio en el τ de los CNQDs, en el primer caso aumentando y en el segundo disminuyendo. Que la variación sea tan pequeña, muy probablemente dentro del error experimental, es un indicativo de que no hay quenching dinámico y que este sería estático en todos los casos.

Cuando se excita el TMPyP libre a 388 nm, se encuentra un tiempo de vida de emisión de $5,2 \pm 0,1 \text{ ns}$ que; en presencia de los CNQDs, aumenta notablemente a valores de entre 5,7 y 7,0 ns dependiendo del tipo de nanopartícula empleado, esto lo adjudicamos al fenómeno de adsorción descripto anteriormente.

Laser Flash Fotólisis

Se prepararon soluciones mezcla de TMPyP con las distintas nanopartículas de forma que la absorbancia final a $\lambda = 355 \text{ nm}$ de cada compuesto sea de 0,100. Se hicieron ensayos en ausencia y en presencia de los CNQDs.

Los experimentos se realizaron con atmósfera de Ar en una ventana de tiempo de 1 a 400 μs y la excitación se realizó con el láser de Nd:YAG en el armónico de 355 nm.

Aparentemente la absorbancia triplete – triplete disminuye en presencia de los CNQDs. Sin embargo, parte de la luz de excitación es absorbida por los CNQDs, que actúan como filtro interno. Por ello los datos para ver si la disminución de la intensidad de la señal se debe únicamente a este efecto se realizó una corrección de los datos mediante la ecuación 3.1.

$$I \propto 1/x \text{ y } x = (1-10^{-A}) \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Donde I es la absorbancia triplete – triplete del TMPyP y A es la absorbancia de los CNQDs a la 355 nm.

A continuación, se muestran los espectros ya corregidos a distintos tiempos luego de la irradiación del láser para las distintas mezclas de nanopartículas con TMPyP.

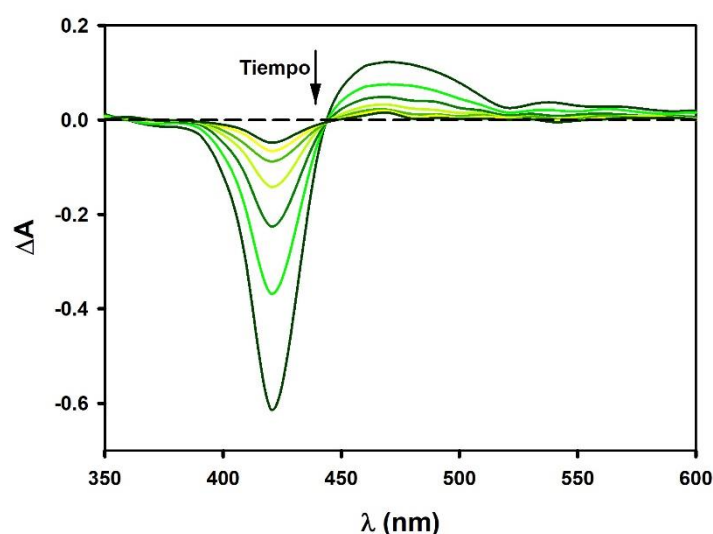


Figura 3.13. Espectro de absorción del triplete de TMPyP obtenido en el experimento de LFP con $\lambda_{\text{ex}} = 355$ nm.

En la Figura 3.13 se observa el espectro de absorción triplete-triplete del TMPyP a distintos tiempos (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 y 400 μs) luego de ser irradiado por el láser de 355 nm. A medida que el tiempo aumenta luego del pulso de irradiación, la intensidad de la absorbancia disminuye. Los espectros obtenidos con un máximo a 470 nm coinciden con los reportados por la bibliografía [37]. El tiempo de decaimiento del triplete obtenido fue de 105 μs .

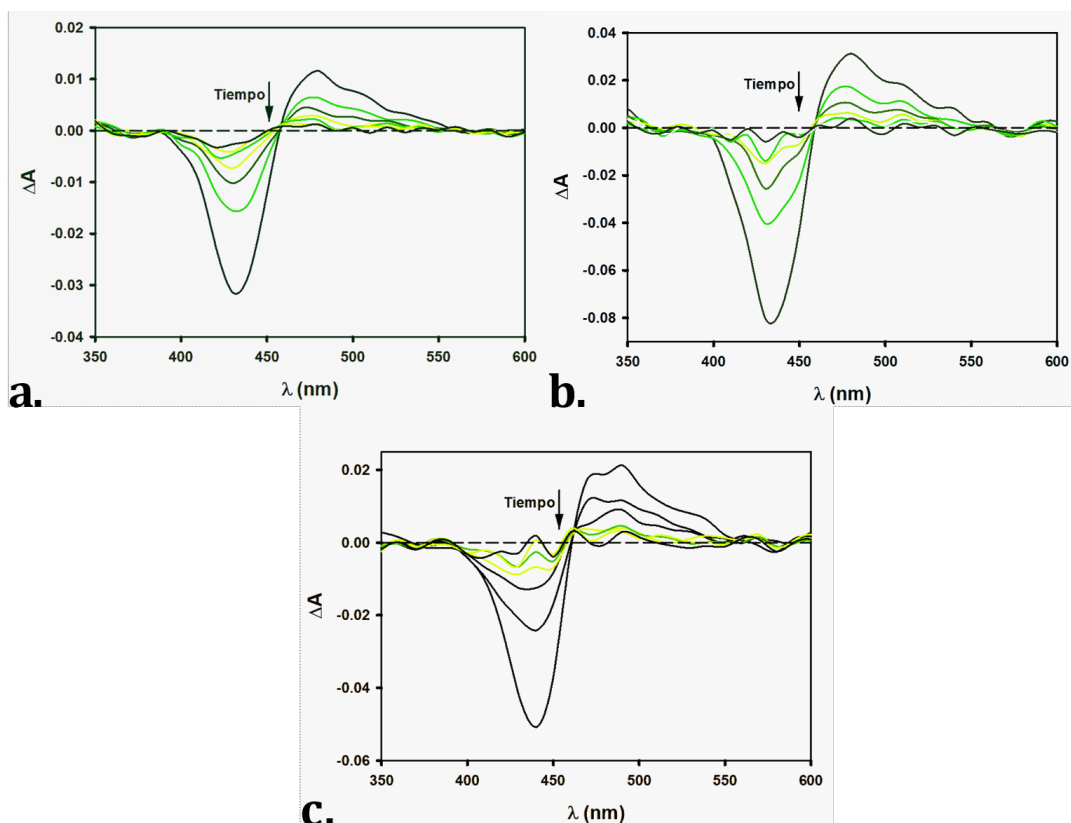


Figura 3.14. Espectros de absorción corregidos por filtro interno del triplete de TMPyP en presencia de los CNQDs Urea 180 con relaciones de absorbancias de 0,1:0,05 (a), 0,1:0,075 (b), y 0,1:0,1 (c), en el experimento de LFP con $\lambda_{\text{ex}} = 355$ nm.

Comparando el espectro de la Figura 3.13 con los espectros corregidos de la Figura 3.14 (obtenidas en presencia de los CNQDS), se puede observar que la absorbancia en el máximo del espectro de absorción triplete – triplete es mayor en el TMPyP solo, que en la mezcla con nanopartículas. Además, a medida que aumenta la concentración de nanopartículas en la solución, disminuye la intensidad de absorción triplete-triplete del TMPyP.

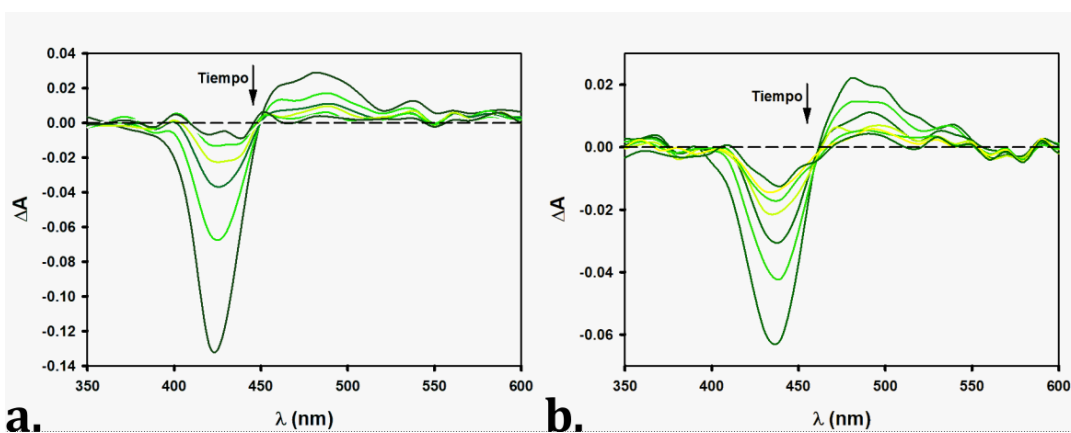


Figura 3.15. Espectros de absorción corregidos por filtro interno del triplete de TMPyP en presencia de los CNQDs Cys 300 con relación de absorbancias 0,1:0,025 (a), y 0,1:0,05 (b) en el experimento de LFP con $\lambda_{\text{ex}} = 355$ nm.

Nuevamente, al comparar el espectro del TMPyP solo (Figura 3.13) con los espectros del TMPyP junto con los CNQDs Cys 300 (Figura 3.15), se ve que la absorbancia en el máximo del espectro de absorción triplete – triplete es menor en la mezcla. Cuando se aumenta la concentración de nanopartículas Cys 300 en la solución con TMPyP, disminuye la absorción triplete – triplete.

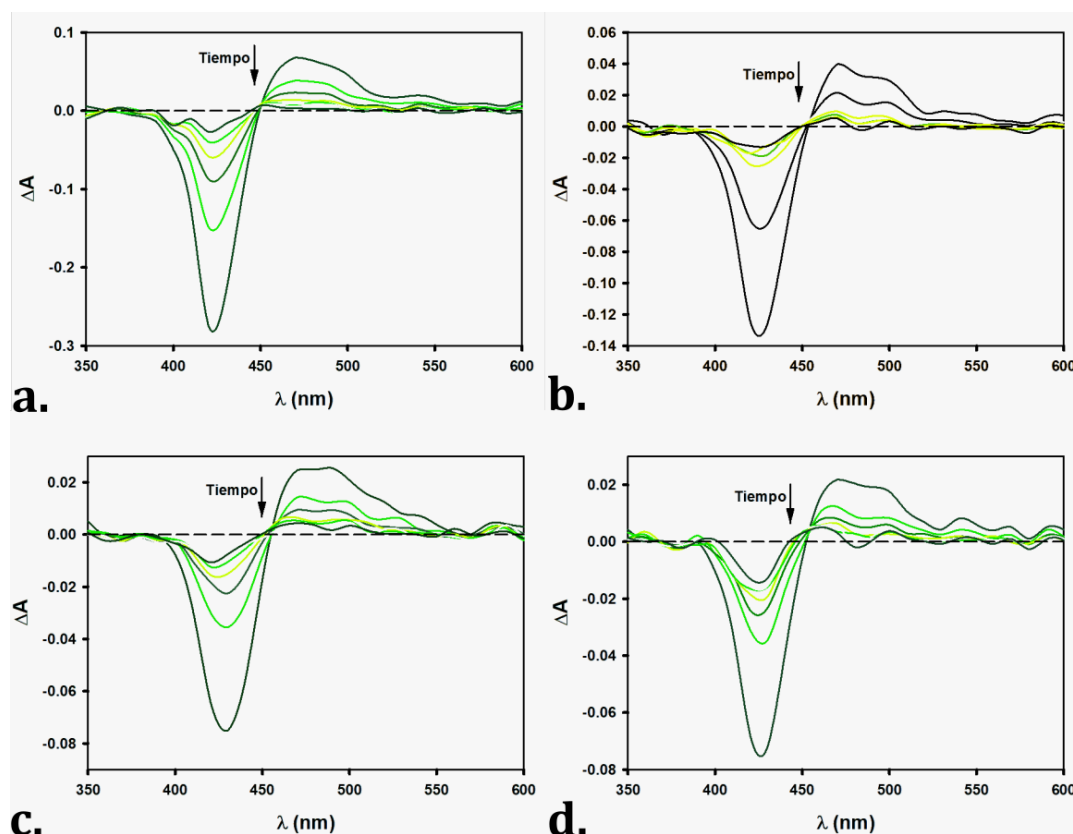


Figura 3.16. Espectros de absorción corregidos por filtro interno del triplete de TMPyP en presencia de los CNQDs Cys 250 con relación de absorbancias 0,1:0,025 (a), 0,1:0,05 (b), 0,1:0,075 (c), y 0,1:0,1 (d) en el experimento de LFP con $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$.

Otra vez se observa que la absorbancia en el máximo del espectro de absorción triplete – triplete es menor en la mezcla de los CNQDs Cys 250 con el TMPyP (Figura 3.16) que en la solución de TMPyP solo (Figura 3.13). Nuevamente, cuando la concentración de CNQDs aumenta en la mezcla, el máximo de absorción del triplete – triplete disminuye.

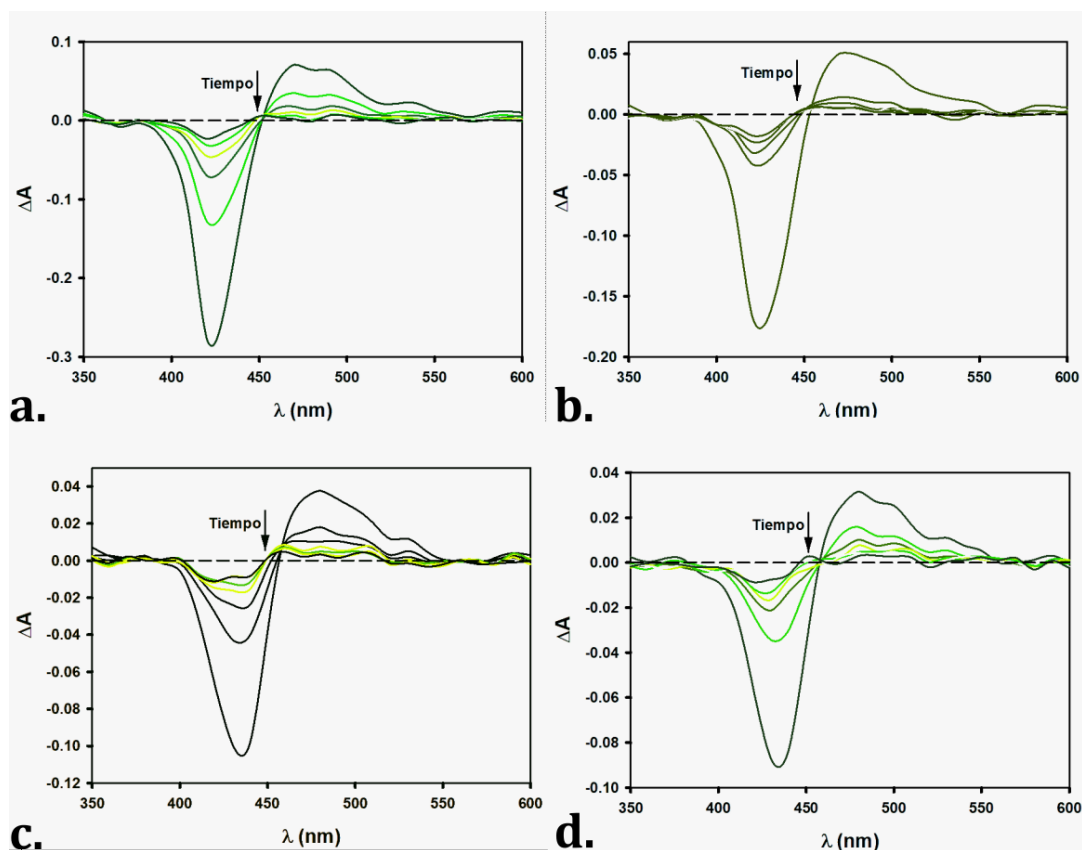


Figura 3.17. Espectros de absorción corregidos por filtro interno del triplete de TMPyP en presencia de los CNQDs Cys 200 con relación de absorbancias 0,1: 0,025 (a), 0,1:0,05 (b), 0,1:0,075 (c), y 0,1:0,1 (d) en el experimento de LFP con $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$.

En la Figura 3.17 (a) (mezcla de CNQDs Cys 200 y TMPyP en relación de absorbancias 0,025 y 0,1, respectivamente), se ve que la absorbancia en el máximo del espectro de absorción triplete – triplete es similar a la del TMPyP solo. Sin embargo, a medida que la concentración de CNQDs Cys 200 en la solución va aumentando, la intensidad del máximo de absorción disminuye.

La disminución en el máximo de absorción que se observa en todas las CNQDs a medida que se aumenta su concentración, se traduce a una disminución en la población del estado triplete – triplete del TMPyP en presencia de los CNQDs. Con este resultado, si los coeficientes de absorción molares del TMPyP libre y adsorbido fueran iguales, se esperaría que una menor formación de especies reactivas por parte del TMPyP cuando está adsorbido sobre las distintas nanopartículas.

Los tiempos de decaimiento para las mezclas variaron entre los 80 μs y los 100 μs , manteniéndose siempre en el orden del tiempo de decaimiento correspondiente al TMPyP solo.

Si bien la absorbancia del estado triplete disminuye en presencia de las nanopartículas, el tiempo de vida de dicho estado no presenta variaciones significativas, indicando que no es afectado por la presencia de los CNQDs. Se descarta entonces cualquier proceso de quenching colisional.

Conclusiones parciales

- Analizando los espectros de absorción UV – Visible se determinó que existe algún tipo de interacción entre el TMPyP y los CNQDs.

- El estudio de espectroscopía de fluorescencia de los CNQDs en presencia y ausencia de TMPyP permitió concluir que ninguna de las nanopartículas participa en procesos de transferencia de energía hacia el TMPyP.

Además, se observó que hay quenching cuando las mezclas de nanopartículas y TMPyP son excitadas a λ_{ex} menores a 300 nm.

- Estudiando los tiempos de vida de fluorescencia de las mezclas de TMPyP y CNQDs, se vio que estos se mantienen constantes y no se acortan respecto al valor obtenido para los CNQDs en ausencia de TMPyP, es decir que no hay quenching dinámico.

Cuando se excita el TMPyP en presencia de los CNQDs, vemos que su tiempo de vida de fluorescencia aumenta en comparación con el τ correspondiente al PS solo como consecuencia de la adsorción.

- Los ensayos de LFP demostraron que al aumentar la concentración de CNQDs, disminuye la absorbancia del estado triplete del TMPyP.

CONCLUSIONES GENERALES

Se lograron sintetizar CNQDs a partir de distintos métodos y se los caracterizó química y físicamente, corroborando su correcta obtención. Se observó sobre la superficie de estas nanopartículas los grupos funcionales característicos reportados para los CNQDs y su análisis de absorción en el espectro UV – Visible señaló la presencia de picos característicos de estas nanopartículas.

Se caracterizó, también, sus cualidades espectroscópicas mediante la construcción de matrices de excitación – emisión, y el análisis de los tiempos de vida de fluorescencia para soluciones de los distintos CNQDs.

Una vez concluida la caracterización, se evaluó la producción de especies reactivas del oxígeno y la citotoxicidad de las nanopartículas, analizando así la posibilidad de estas nanopartículas de funcionar como fotosensibilizadores.

Se observó que los cuatro CNQDs sintetizados generaron, en distinta medida, peróxido de hidrógeno, siendo los Cys 300 quienes tuvieron la mayor producción.

Por otro lado, los CNQDs Cys 250 y Cys 200 son quienes presentaron formación de oxígeno singlete con altos rendimientos cuánticos.

Durante los ensayos de citotoxicidad se vio que todas las nanopartículas presentan viabilidad hasta concentraciones de 0,75 mg/mL, inclusive.

Se observó también que a concentraciones de 0,75 mg/mL los CNQDs Urea 180 y Cys 250 hay diferencias en el % de viabilidad celular para las dos condiciones estudiadas (irradiación y no irradiación), siendo la viabilidad de las células irradiadas menor a la de las células no irradiadas.

Por último, los CNQDs Cys 200 y Cys 300 no presentaron cambios en la viabilidad celular en presencia o ausencia de irradiación para ninguna concentración del rango estudiado.

Considerando estos resultados, concluimos que las nanopartículas CNQDs Urea 180 y CNQDs Cys 250 son las más adecuadas para utilizar como posible PS en la PDT.

Luego de estudiar a los CNQDs, y conociendo las características del TMPyP, se decidió analizar si las nanopartículas sintetizadas podrían funcionar como potenciadores de la actividad fotosensibilizadora del TMPyP.

El estudio de los espectros de absorción en la región UV – Visible concluyó que existe algún tipo de interacción entre los CNQDs y el TMPyP, en donde este último es adsorbido por las nanopartículas. Por otro lado, el análisis de los espectros de emisión de fluorescencia en estado estacionario de las nanopartículas, en presencia y ausencia del fotosensibilizador, demostró que no hay ningún tipo de proceso de transferencia de energía, pero sí se observó quenching cuando las mezclas se excitan con longitudes de onda de menores a 300 nm. Además, aunque pequeño en comparación, las nanopartículas Cys 200, Cys 250 y Cys 300 también presentaron quenching cuando fueron excitadas con longitudes de onda de entre 300 y 400 nm.

Se observó también que los tiempos de vida de fluorescencia de las nanopartículas en presencia de distintas concentraciones de TMPyP no se modificaban, indicando la ausencia de quenching dinámico.

Por otra parte, la presencia o ausencia del fotosensibilizador no modificó los τ de las nanopartículas. El tiempo de vida de fluorescencia del TMPyP en presencia de los CNQDs es mayor que el del compuesto solo, lo que se atribuye a la adsorción del mismo en los CNQDs.

Para finalizar se realizaron ensayos de LFP que permitieron estudiar el comportamiento de la concentración del estado triplete del TMPyP cuando están presentes distintas cantidades de nanopartículas. Se observó que la absorbancia del estado triplete disminuye a medida que aumenta la concentración de nanopartículas, lo que podría traducirse en una disminución en la cantidad de especies reactivas del oxígeno que pueden formarse.

AGRADECIMIENTOS

Para concluir con este trabajo quiero tomarme un momento para agradecerle a todas las personas que lo hicieron posible.

A mi director Daniel, por darme el espacio y ser el ideólogo de este trabajo; por su paciencia y apoyo durante el último año y medio.

A mi co-directora Belén, porque sin ella nada de esto hubiera sido posible. Gracias por estar siempre para resolver todas mis dudas, para ayudarme cuando me mandaba una macana y por tenerme infinita paciencia.

A todos los integrantes del grupo LEAR, el Colo, Emi, Lau, Darlin, Joaquín, Lu, Fran, María Laura y Gaby, por siempre dar una mano cuando se los necesitaba, por responder dudas, por los mates, los almuerzos y las facturas.

A Juli y Dani del IMBICE por ayudarme y tenerme paciencia con los ensayos biológicos.

A Bruno, por su ayuda con todas las medidas del láser.

Y a todos los que me apoyaron incondicionalmente durante estos últimos cinco años, sin ustedes nada de esto hubiera sido posible.

Gracias.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. H. Gold, "History of Photodynamic Therapy," *Photodyn. Ther. Dermatology*, pp. 1–4, 2011.
- [2] Á. Juarranz, P. Jaén, F. Sanz-Rodríguez, J. Cuevas, and S. González, "Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications," *Clin. Transl. Oncol.*, vol. 10, no. 3, pp. 148–154, 2008.
- [3] S. S. Lucky, K. C. Soo, and Y. Zhang, "Nanoparticles in photodynamic therapy," *Chem. Rev.*, vol. 3, no. 115, pp. 1990–2042, 2015.
- [4] D. K. Chatterjee, L. S. Fong, and Y. Zhang, "Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 15, pp. 1627–1637, 2008.
- [5] Y. C. Lu *et al.*, "Facile synthesis of oxygen and sulfur co-doped graphitic carbon nitride fluorescent quantum dots and their application for mercury(ii) detection and bioimaging," *J. Mater. Chem. C*, vol. 3, no. 1, pp. 73–78, 2015.
- [6] P. Namdari, B. Negahdari, and A. Eatemadi, "Synthesis, properties and biomedical applications of carbon-based quantum dots: An updated review," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 87, no. 88, pp. 209–222, 2017.
- [7] J. Zhou, Y. Yang, and C. Y. Zhang, "A low-temperature solid-phase method to synthesize highly fluorescent carbon nitride dots with tunable emission," *Chem. Commun.*, vol. 49, no. 77, pp. 8605–8607, 2013.
- [8] A. Garcia-Sampedro, A. Tabero, I. Mahamed, and P. Acedo, "Multimodal use of the porphyrin TMPyP: From cancer therapy to antimicrobial applications," *J. Porphyr. Phthalocyanines*, vol. 23, no. 1–2, pp. 11–27, 2019.
- [9] S. Speiser, "Photophysics and mechanisms of intramolecular electronic energy transfer in bichromophoric molecular systems: Solution and supersonic jet studies," *Chem. Rev.*, vol. 96, no. 6, pp. 1953–1976, 1996.
- [10] T. Förster, "10th Spiers Memorial Lecture. Transfer mechanisms of electronic excitation," *Discuss. Faraday Soc.*, vol. 27, no. 10, pp. 7–17, 1959.
- [11] P. R. Griffiths and J. A. DeHaseth, "Fourier transform infrared spectrometry," *Science (80-.)*, vol. 222, no. 4621, pp. 297–302, 1983.
- [12] "FT-IR Spectroscopy - Attenuated Total Reflectance (ATR)," *Perkin Elmer Life Anal. Sci.*, 2005.
- [13] D. Campbell, R. A. Pethrick, and J. R. White, "Ultraviolet – visible spectroscopy," *RSC, Adv. Chem. Sci.*, pp. 58–66, 2018.
- [14] D. A. Skoog, D. M. West, J. Holler, and S. R. Crouch, *Fundamento de Química Anlitica*. 2015.
- [15] B. Wolfgang, A. Bergmann, and C. Biskup, "Multispectral Fluorescence Lifetime Imaging by TCSPC," *Microsc. Res. Tech.*, vol. 70, no. 2, pp. 403–409, 2007.
- [16] C. C. Allain, L. S. Poon, C. S. G. Chan, W. Richmond, and P. C. Fu, "Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol," *Clin. Chem.*, vol. 21, no. 11, pp. 1605–1608, 1975.
- [17] P. R. Ogilby, "Singlet oxygen: There is indeed something new under the sun," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, no. 8, pp. 3181–3209, 2010.
- [18] S. GC, "Alternatives to In vivo Studies in Toxicology," *Gen. Appl. Toxicol.*, no. 1987, 1999.

- [19] G. Eisenbrand *et al.*, "Methods of in vitro toxicology," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 40, no. 2–3, pp. 193–236, 2002.
- [20] J. Jiménez, N. González, M. Fernández, C. Elvira, A. López, and J. San Román, "Estudio de la biocompatibilidad in vitro de polimeros metacrílicos derivados de pirrolidona/ina," *Biomecánica*, vol. 15, no. 1, pp. 63–71, 2007.
- [21] D. Pan *et al.*, "Cutting sp² clusters in graphene sheets into colloidal graphene quantum dots with strong green fluorescence," *J. Mater. Chem.*, vol. 22, no. 8, pp. 3314–3318, 2012.
- [22] C. L. Li *et al.*, "Synthesis of photoluminescent carbon dots for the detection of cobalt ions," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 3, pp. 2285–2291, 2015.
- [23] W. Wang, J. C. Yu, Z. Shen, D. K. L. Chan, and T. Gu, "G-C₃N₄ quantum dots: Direct synthesis, upconversion properties and photocatalytic application," *Chem. Commun.*, vol. 50, no. 70, pp. 10148–10150, 2014.
- [24] J. Wen, J. Xie, X. Chen, and X. Li, "Applied Surface Science Preface : Graphene and C₃N₄-based photocatalysts," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 391, pp. 72–123, 2017.
- [25] C. Zhu *et al.*, "A new mild, clean and highly efficient method for the preparation of graphene quantum dots without by-products," *J. Mater. Chem. B*, vol. 3, no. 34, pp. 6871–6876, 2015.
- [26] C. Li and Y. Yue, "Fluorescence spectroscopy of graphene quantum dots: Temperature effect at different excitation wavelengths," *Nanotechnology*, vol. 25, no. 43, 2014.
- [27] B. Valeur, *Molecular Fluorescence Principles and Applications*, vol. 8. 2001.
- [28] M. H. Chan *et al.*, "Near-Infrared Light-Mediated Photodynamic Therapy Nanoplatfrom by the Electrostatic Assembly of Upconversion Nanoparticles with Graphitic Carbon Nitride Quantum Dots," *Inorg. Chem.*, vol. 55, no. 20, pp. 10267–10277, 2016.
- [29] R. Zellner, M. Exner, and H. Herrmann, "Absolute OH quantum yields in the laser photolysis of aqueous solutions of nitrate, nitrite and H₂O₂ at 308 and 351 nm," *Physico-chemical Behav. Atmos. Pollut. Proc., 5th Symp. Varese, 1989*, no. 3, pp. 300–306, 1990.
- [30] U. Technologies, "Ultraviolet Absorption Spectrum." [Online]. Available: <http://www.h2o2.com/technical-library/physical-chemical-properties/radiation-properties/default.aspx?pid=65&name=Ultraviolet-Absorption-Spectrum>. [Accessed: 05-Feb-2020].
- [31] D. He, A. M. Jones, S. Garg, A. N. Pham, and T. D. Waite, "Silver nanoparticle-reactive oxygen species interactions: Application of a charging-discharging model," *J. Phys. Chem. C*, vol. 115, no. 13, pp. 5461–5468, 2011.
- [32] M. B. Rivas Aiello, J. J. Romero, S. G. Bertolotti, M. C. Gonzalez, and D. O. Mártire, "Effect of silver nanoparticles on the photophysics of riboflavin: Consequences on the ROS generation," *J. Phys. Chem. C*, vol. 120, no. 38, pp. 21967–21975, 2016.
- [33] F. Wilkinson and J. G. Brummer, "Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution," *J. Phys. Chem. Ref. Data*, vol. 10, no. 4, pp. 809–999, 1981.
- [34] L. Rovati, P. Fabbri, L. Ferrari, and F. Pilati, "Plastic Optical Fiber pH Sensor Using a Sol-Gel Sensing Matrix," *Fiber Opt. Sensors*, 2012.
- [35] X. Zhang *et al.*, "Single-layered graphitic-C₃N₄ quantum dots for two-photon fluorescence imaging of cellular nucleus," *Adv. Mater.*, vol. 26, no. 26, pp. 4438–4443, 2014.

[36] E. Alarcón, A. Aspée, E. B. Abuin, and E. A. Lissi, "Evaluation of solute binding to proteins and intra-protein distances from steady state fluorescence measurements," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 106, no. 1, pp. 1–17, 2012.

[37] N. M. Barbosa Neto *et al.*, "Excited states absorption spectra of porphyrins - Solvent effects," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 587, pp. 118–123, 2013.